

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Mgr. Michala Dušková

**Biochemická a molekulární podstata specifických vlastností
nekonvenčních osmotolerantních kvasinek**

**Biochemical and molecular basis of specific properties of non-
conventional osmotolerant yeast**

Dizertační práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Sychrová, DrSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 25. 8. 2015

.....

Tato práce vznikla v letech 2009 – 2015 ve Fyziologickém ústavu AV ČR, v.v.i., za podpory:

GA ČR P503/10/0307 Molekulární podstata specifických vlastností osmotolerantních kvasinek *Z. rouxii*, *Z. bailii* a *D. hansenii* a jejich biotechnologické aplikace

GA ČR 15-03708S Specifické vlastnosti kvasinek rodu *Saccharomyces* a druhu *Dekkera bruxellensis* a jejich využití v biotechnologiích a potravinářství

GA UK 299611/2011/B-Bio/PrF Biochemická a molekulární podstata specifických vlastností nekonvenčních osmotolerantních kvasinek

LLP Erasmus - Lifelong Learning Programme - Erasmus Practical Placement (2012/2013)

Výsledky byly doposud publikovány ve třech odborných člancích a jednom rukopise připraveném k odeslání do tisku:

Bubnová, M., J. Zemančíková & H. Sychrová, (2014) Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses. *Yeast* **31**: 309-321.

Dušková, M., D. Borovikova, P. Herynková, A. Rapoport & H. Sychrová, (2015) The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions. *FEMS Microbiol Lett* **362**: 1-8.

Dušková, M., C. Ferreira, C. Lucas & H. Sychrová, (2015) Two glycerol uptake systems contribute to the high osmotolerance of *Zygosaccharomyces rouxii*. *Mol Microbiol* **97**: 541-559.

Dušková, M., C. Lucas, & H. Sychrová, (rukopis) The glycerol transporter from *Zygosaccharomyces rouxii* improves the fitness of *Saccharomyces cerevisiae* assimilating mannitol.

Na tomto místě bych ráda poděkovala především RNDr. Haně Sychrové, DrSc. za odborné vedení a čas, který mi věnovala v průběhu mého studia a dále pak za veškeré znalosti, které jsem jejím prostřednictvím mohla získat. Velké díky patří všem současným i minulým členům Oddělení membránového transportu Fyziologického ústavu AV ČR v.v.i. a to především za vytvoření přátelského prostředí a všestrannou pomoc.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému manželovi a celé rodině za podporu, trpělivost a zázemí, které mi v průběhu mých studijních let poskytovali.

Abstrakt

Jednobuněčné organismy jako například kvasinky jsou neustále vystavovány měnícímu se okolnímu prostředí, zvláště pak změnám koncentrace osmoticky aktivních látek. Kvasinkové druhy schopné čelit těmto měnícím se podmínkám lépe, jsou považovány za osmotolerantní (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Pichia sorbitophila*, *Debaryomyces hansenii*, apod.). Osmotolerance kvasinek závisí na řadě fyziologických parametrů, ale nejdůležitější vlastností je účinný metabolismus tzv. vnitřních osmolytů. Tuto úlohu zastupuje ve většině kvasinkových druhů malá molekula glycerolu. Při hypoosmotickém stresu se kvasinky zásob glycerolu zbavují, při adaptaci na vysoký osmotický tlak (hyperosmotický stres) naopak glycerol syntetizují a akumulují. Modelová *Saccharomyces cerevisiae* má dva transportní systémy pro glycerol, kanál *ScFps1* sloužící především pro vypouštění glycerolu v případě hypoosmotických podmínek a současně také přenašeč *ScStl1* akumulující glycerol v průběhu hyperosmotického stresu.

V rámci této práce byly nejprve detailně studovány fyziologické vlastnosti tří výše zmíněných nekonvenčních osmotolerantních druhů. Bylo zjištěno, že i přestože se tyto druhy příliš neliší od modelové *S. cerevisiae* v základních morfologických vlastnostech, jejich rozdílnost spočívá především ve schopnosti přežívat vysychání, vyrovnávat se s přítomností toxických iontů, v hospodaření s K^+ jakožto i ve schopnosti využívat různé alternativní zdroje uhlíku. Dále bylo zjištěno, že genomy osmotolerantních kvasinkových druhů jsou ve většině případů nositeli většího počtu genů kódujících možné přenašeče glycerolu do buněk (homology *ScSTL1*). V genomu *Z. rouxii* byly nalezeny dvě takovéto sekvence (*ZrSTL1* a *ZrSTL2*) a v *D. hansenii* pak celkem osm (detailněji charakterizována byla jedna z nalezených sekvencí, *DhSTL2*). Oba geny nalezené v *Z. rouxii* kódují funkční přenašeče glycerolu v plasmatické membráně buněk a jejich vliv na metabolismus je mnohem širší než v případě *S. cerevisiae*. Získané výsledky potvrzují, že oba geny se výraznou měrou podílejí na celkové osmotoleranci *Z. rouxii* a jejich odlišná úroveň exprese zajišťuje komplexní řízení transportu glycerolu do buněk. Úspěšná heterologní exprese *ZrSTL1* v *S. cerevisiae* poukázala na skutečnost, že tento gen je schopen zcela nahradit *ScSTL1* a může být využit pro zlepšení vlastností průmyslově využívaných kmenů *S. cerevisiae*. Také podrobným studiem genů *ScSTL1*, *ScFPS1* a *ScHOG1* byly získány zcela nové poznatky týkající se jejich zapojení v metabolismu glycerolu kvasinky *S. cerevisiae*.

Abstract

Unicellular organisms such as yeasts are permanently exposed to environmental changes, especially to changes of the concentration of osmotically active substances. Yeast species, which are able to cope with these changes properly, are called osmotolerant (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Pichia sorbitophila*, *Debaryomyces hansenii*, etc.). The osmotolerance of yeasts depends on many physiological parameters but the most important is the efficient metabolism of internal osmolytes. This role is played by the small molecule of glycerol in most yeast species. Yeasts have to release the surplus of glycerol during the hypoosmotic shock. On the other hand, the hyperosmotic conditions require synthesis and accumulation of this small compound in a high quantity. The model yeast *Saccharomyces cerevisiae* has two systems transporting glycerol. First of them is the *ScFps1* channel which is important mainly for releasing of glycerol during hypoosmotic shock. The second transporter, called *ScStl1*, is employed in accumulation of glycerol in case of hyperosmotic conditions.

Detailed study of physiological properties of the three above mentioned species was performed within this work. Although they do not differ in basic morphological parameters from *S. cerevisiae*, their difference lies in the ability to survive desiccation, to cope with toxic cations, in potassium homeostasis or in utilization of various carbon sources. According to our data, the genomes of osmotolerant yeast species carry higher amount of genes encoding putative glycerol transporters (homologues of *ScSTL1*). Two sequences (*ZrSTL1* and *ZrSTL2*) were found in the genome of *Z. rouxii* and eight homologues (only one candidate was characterized in detail, *DhSTL2*) in *D. hansenii*. We found that both genes from *Z. rouxii* encode functional plasma-membrane glycerol transporters mediating the uptake of glycerol in symport with protons and that their influence on metabolism is much wider than in *S. cerevisiae*. Both genes are involved in high osmotolerance of *Z. rouxii* and their different level of expression is responsible for the complex regulation of glycerol accumulation. The successful heterologous expression of *ZrSTL1* in *S. cerevisiae* highlighted the ability of this gene to fully complement for *ScSTL1* in its function and to improve the properties of industrial *S. cerevisiae*. The detailed study of *ScSTL1*, *ScFPS1* a *ScHOG1* helped us to find completely new knowledge regarding their involvement in metabolism of *S. cerevisiae*.

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
Obsah.....	7
1. Úvod.....	9
1.1 Kvasinky jako modelový organismus.....	9
1.2 Nekonvenční kvasinkové druhy	11
1.2.1 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	13
1.2.2 <i>Debaryomyces hansenii</i>	14
1.2.3 <i>Pichia sorbitophila</i>	15
1.3 Obecné mechanismy transportu látek přes plasmatickou membránu.....	16
1.3.1 Prostá difuze	17
1.3.2 Kanály	18
1.3.3 Přenašeče	19
1.3.4 ATPasy	20
1.3.5 Kinetika transportu	21
1.4 Obecný mechanismus odpovědi buněk na stres	24
1.4.1 Homestase vody	25
1.4.2 Signální dráhy MAPK v kvasinkách.....	26
1.5 Funkce vnitřních osmolytů	35
1.5.1 Metabolismus glycerolu	38
1.5.2 Konzumace glycerolu kvasinkami	40
2. Cíle práce	47
3. Materiál a metody	48
3.1 Materiál.....	48
3.1.1 Kmeny kvasinek a bakterií.....	48
3.1.2 Kultivační půdy	50
3.1.3 Plasmidy	50
3.2 Metody.....	53
3.2.1 Mikrobiologické metody	53
3.2.2 Molekulárně-biologické metody	53
3.2.3 Biochemické metody	53
3.2.4 Biofyzikální metody	54

3.2.5	Bioinformatické metody.....	54
4.	Výsledky	55
4.1	Publikace č. 1 - Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses.	56
4.2	Publikace č. 2 - The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions.	58
4.3	Publikace č. 3 - Two glycerol uptake systems contribute to the high osmotolerance of <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	59
4.4	Rukopis č. 1 - The glycerol transporter from <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> improves the fitness of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> assimilating mannitol.	61
4.5	Nepublikované výsledky – Aktivní přenašeče glycerolu v <i>Debaryomyces hansenii</i> 62	
4.5.1	Bioinformatická analýza genů kódujících možné kandidáty na glycerolové přenašeče v <i>D. hansenii</i>	62
4.5.2	Heterologní exprese genu <i>DhSTL2</i> v kvasince <i>S. cerevisiae</i> W303 <i>hog1Δ stl1Δ</i> pomocí mnohokopiových plasmidů	64
4.5.3	Heterologní exprese genu <i>DhSTL2</i> integrovaného v genomu buněk <i>S. cerevisiae</i> W303 <i>fps1Δ</i>	70
4.5.4	Závěr.....	76
5.	Souhrnný závěr a diskuze	79
6.	Seznam použitých zkratk	84
7.	Seznam použité literatury	86

1. Úvod

1.1 Kvasinky jako modelový organismus

Kvasinky jsou atraktivní skupinou nižších eukaryotických organismů provázející lidstvo již po tisíciletí. Do dnešní doby bylo charakterizováno více jak 1500 různých kvasinkových druhů, přičemž jejich celkové množství na Zemi je několikanásobně vyšší (Kurtzman *et al.*, 2010). Nacházejí uplatnění ve výzkumu, v potravinářství, v zemědělství, v chemickém průmyslu a v neposlední řadě také v medicínských disciplínách. Tradiční využití kvasinek vychází z jejich schopnosti přetvářet jednoduché cukry na alkohol a CO₂, tedy kvasit, jinými slovy fermentovat. Podílejí se tak na výrobě piva, vína, kvašeného jablečného moštu (cider), saké, pálenek, ale i pekařských výrobků, sýrů, salámů apod. Méně tradiční, ale v dnešní době stále více populární je využití kvasinek při produkci bioethanolu, enzymů a celé řady látek s medicínským a farmaceutickým významem (Borodina & Nielsen, 2014, Nielsen & Jewett, 2008, Johnson, 2013). Kvasinky se nejen hojně vyskytují v našem okolí, ale osidlují také různé části lidského těla a mohou se stát původci řady infekčních onemocnění.

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je hojně průmyslově využívaným a pravděpodobně také nejvíce prostudovaným eukaryotickým organismem naší planety. K její popularitě přispívá skutečnost, že se jedná o první eukaryotický organismus, jehož genom byl kompletně sekvenován (Goffeau *et al.*, 1996). Již před zveřejněním genomové sekvence byla vyvinuta celá škála technik, které umožňovaly genetickou manipulaci tohoto jednoduše se dělícího organismu. Za posledních 20 let, které uplynuly od zveřejnění kompletní genomové sekvence, došlo k mohutnému rozvoji molekulárně-biologických metod významně ulehčujících studium *S. cerevisiae* a současně také posouvajících hranice našich vědomostí směrem kupředu. Tyto metody nám pomáhají pochopit nejen fungování a fyziologii kvasinek samotných, ale především eukaryotických buněk jako takových. Techniky využívané při studiu *S. cerevisiae* se také stávají jakousi předlohou pro vývoj nových postupů využívaných pro práci i s jinými eukaryotickými buňkami a méně probádanými kvasinkovými druhy.

Stále se zvyšující nároky na ekologičnost veškerých průmyslových postupů dělají z naší doby věk hledání alternativních zdrojů a nových přístupů k výrobě. Kvasinky se tak dostávají do popředí zájmu ve snaze o co nejefektivnější využití jejich schopností v širokém spektru průmyslových odvětví (Johnson, 2013). Začínají se využívat i méně známé, tzv. nekonvenční kvasinkové rody jako například *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Torulaspora*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces*, *Pachysolen*, *Candida* a množství dalších (Mattanovich *et al.*, 2014).

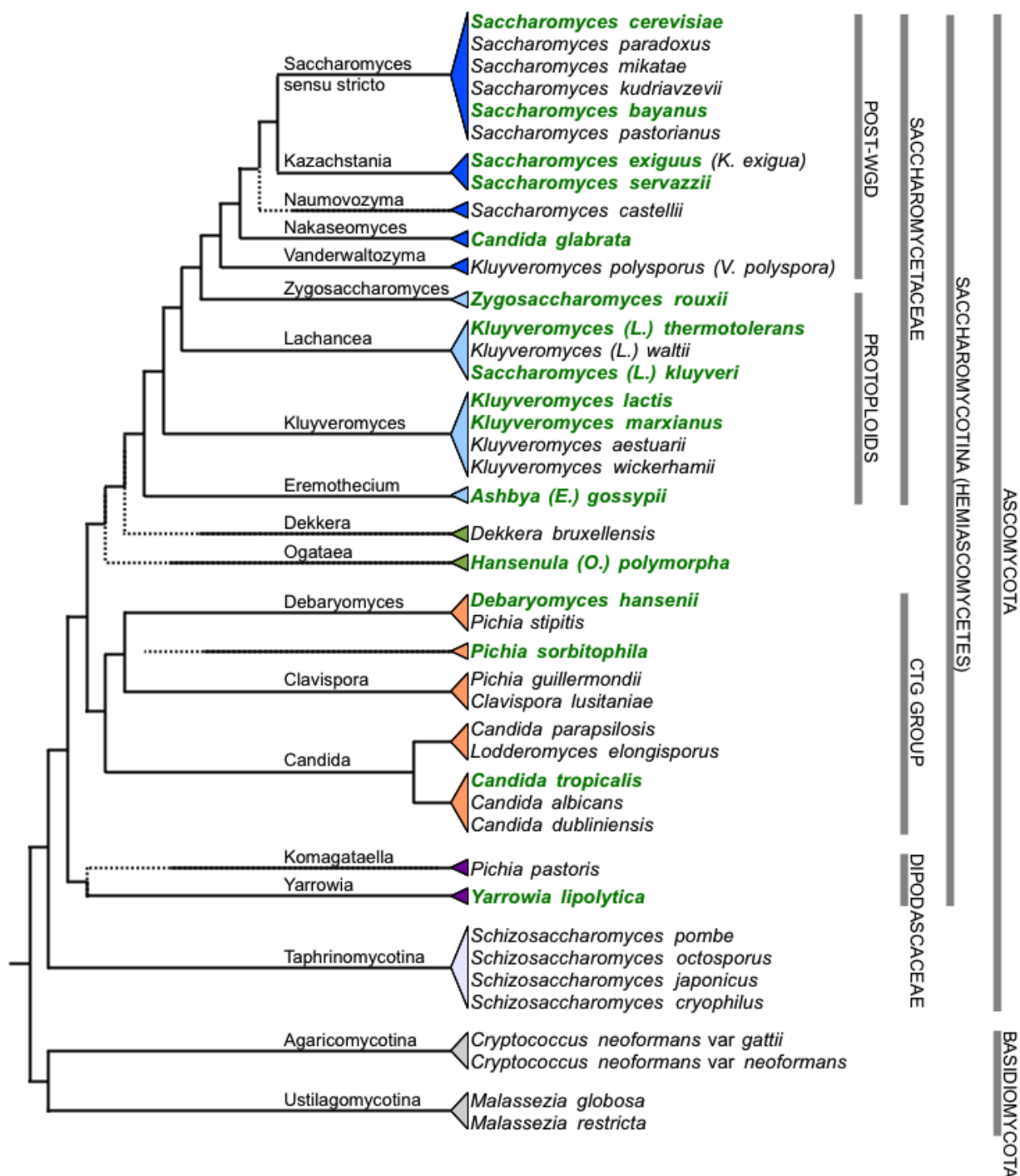
Jejich výjimečnost spočívá především ve schopnosti obývat z našeho pohledu nehostinná místa (prostředí s velmi vysokou koncentrací osmoticky aktivních látek – *Debaryomyces*, *Zygosaccharomyces*; s vysokou či naopak nízkou teplotou – *Debaryomyces*, *Candida*; extrémními hodnotami pH – *Zygosaccharomyces*; nedostatkem živin – *Pichia*), v produkci aromatických látek s významným potenciálním využitím (*Yarrowia*), ve schopnosti fermentovat alternativní zdroje uhlíku (*Hansenula*, *Pachysollen*, *Pichia*) či ve vhodnosti jejich využití coby probiotik (*Debaryomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*; Liong, 2011, Mattanovich *et al.*, 2014, Kurtzman *et al.*, 2010, Breuer & Harms, 2006, Dakal *et al.*, 2014).

Právě jedinečnost metabolických a fyziologických vlastností těchto kvasinek vzbuzuje zájem čím dál většího množství výzkumných skupin. Hlubší znalosti, popřípadě následné využití získaných poznatků představují velký potenciál pro průmyslová odvětví zabývající se zdokonalováním využívaných kvasinkových druhů.

Prvním z úkolů předkládané dizertační práce je právě detailní studium několika nekonvenčních kvasinkových druhů a především jejich odpovědi na změny vnějších podmínek (Publikace č. 1). Pravděpodobně nejčastější změnou, které jsou kvasinky jako jednobuněčné organismy vystavovány, je změna koncentrace osmoticky aktivních látek v okolním prostředí. Právě schopnost vyrovnat se s touto změnou vypovídá mnohé o celkové fyziologii a odolnosti daného kvasinkového druhu. Je známo, že největší podíl v odpovědi buněk kvasinek na osmotický stres nese metabolismus glycerolu (ať již jeho syntéza či transport). Další část předkládané práce je věnována vlivu jednotlivých transportérů glycerolu na fyziologii a především osmotoleranci kvasinky *S. cerevisiae* BY4741 (Publikace č. 2). Největší důraz je však kladen na charakterizaci transportního systému pro vstup glycerolu do buněk *Zygosaccharomyces rouxii* a *Debaryomyces hansenii* (Publikace č. 3, kapitola nepublikovaných výsledků 4.5). Heterologní exprese transportního systému pro glycerol nalezeného v genomu kvasinky *Z. rouxii* a detailní studium takto vzniklých kmenů *S. cerevisiae* je pak prvním krokem ve zdokonalování průmyslově využívaných kmenů (Rukopis č. 1).

1.2 Nekonvenční kvasinkové druhy

V odborné literatuře je velmi často používán pojem nekonvenční kvasinkový druh, v současné době však neexistuje obecně akceptovaná definice tohoto pojmu. Mnozí nazývají nekonvenčními kvasinkami všechny, které nepatří k rodu *Saccharomyces*. Jiní považují i *Schizosaccharomyces pombe* a *Candida albicans* za konvenční druhy (Spencer *et al.*, 2002). Nic to však nemění na skutečnosti, že toto rozdělení stále více ztrácí na významu, neboť přibývá tzv. nekonvenčních kvasinek, které se dostávají do popředí našeho zájmu a zastiňují tak kdysi hojně využívané a studované konvenční druhy. Pro účely této práce jsou jako nekonvenční označovány všechny kvasinky, vyjma tří výše zmíněných, tedy *S. cerevisiae*, *Sch. pombe* a *C. albicans*. Předkládaná dizertační práce je zaměřena především na studium nekonvenční kvasinky *Z. rouxii* jakožto i dalších osmotolerantních druhů, těmi jsou *D. hansenii* a *Pichia sorbitophila*. Mimo tyto druhy, které jsou v následujících kapitolách detailně představeny, nacházíme při tradičních fermentacích a průmyslových výrobních postupech i další významné zástupce nekonvenčních kvasinkových druhů (*Dekkera bruxellensis*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. kudriavzevii*, *Pachysolen tannophilus*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, apod.). Vzájemné příbuzenské vztahy mezi *S. cerevisiae* a ostatními kvasinkami, jejichž genom byl kompletně sekvenován jsou znázorněny na Obrázku 1 (Sherman *et al.*, 2009).



Obrázek 1: Fylogenetický strom sekvenovaných kvasinkových genomů. Zeleně označené druhy byly sekvenovány konsorciem Génolevures. Projekt Génolevures byl zahájen v roce 1998 ve Francii a jeho smyslem je systematicky sekvenovat genomy příbuzných druhů kvasinek patřících do třídy *Hemiascomycetes*. Porovnáváním sekvencí, jakožto i strukturní a funkční analýzou genů konsorcium získává informace vedoucí k objasnění mechanismů molekulární evoluce eukaryotického genomu. Převzato a upraveno z Génolevures (Sherman *et al.*, 2009).

1.2.1 *Zygosaccharomyces rouxii*

Zygosaccharomyces rouxii, původním názvem *Saccharomyces rouxii*, byla poprvé izolována z marmelád a ovocných šťáv (Kurtzman *et al.*, 2010, Arx *et al.*, 1977). Je popsána jako osmotolerantní kvasinka běžně obývající prostředí s vysokou koncentrací cukrů jako je například med, koncentrovaný vinný mošt, marmelády, marcipán, javorový sirup, džusy apod. (Barnett *et al.*, 2000, Kurtzman, 1990). Jedná se o velice heterogenní kvasinkový druh, jehož jednotliví zástupci se výrazně liší svými fyziologickými vlastnostmi, strukturou genomu, vlastnostmi buněčné stěny, osmotolerancí apod. (Tokuoka & Ishitani, 1991, Dakal *et al.*, 2014, Pribylova *et al.*, 2007a, Pribylova *et al.*, 2007c). Bylo zjištěno, že prostředí s více než 60 % glukosou či 3 M NaCl nečiní zástupcům druhu *Z. rouxii* větší růstové problémy (Lages *et al.*, 1999, Solieri *et al.*, 2014). Vedle extrémní osmotolerance se *Z. rouxii* vyznačuje také tzv. fruktofilií, tedy schopností konzumovat fruktosu rychleji než glukosu, čímž se odlišuje od glukofilní kvasinky *S. cerevisiae* (Emmerich & Radler, 1983, Leandro *et al.*, 2014). Další klíčovou vlastností *Z. rouxii* představuje její odolnost k slabým organickým kyselinám, které se používají coby konzervanty v potravinářském průmyslu. Potraviny s vysokou koncentrací fermentovatelných cukrů a nízkým pH (ovocné šťávy, džusy, džemy, kečupy, med či různé dresinky) jsou tedy ideálním místem pro život tohoto výjimečného kvasinkového druhu a jsou jím tak i nejčastěji kontaminovány (Stratford, 2006). *Z. rouxii* se řadí mezi malou skupinu organismů, které jsou schopny kontaminovat potraviny i při dodržování všech zásad správné výrobní praxe. Obdobné vlastnosti vykazuje i její blízce příbuzná *Z. bailii*, u které bylo prokázáno, že za její výraznou toleranci vůči slabým kyselinám stojí především snížení vnitrobuněčného pH a tím omezení transportu kyselin do buněk (Stratford *et al.*, 2013). *Z. rouxii* ale není pouze zdrojem kontaminací, je také hojně využívána při výrobě tradičních asijských fermentovaných pochutin jako například sojová omáčka a pasta Miso (Suezawa *et al.*, 2008). Sojové boby jsou nejprve fermentovány plísní *Aspergillus oryzae*, následně ponořeny do solného roztoku (typicky 18 – 20 % NaCl) a *Z. rouxii* tak může pomalu za anaerobních podmínek kvasit cukry a aminokyseliny ve směsi obsažené (Tamang & Kailasapathy, 2010). Tím dochází k produkci sloučenin, které dodávají výsledným produktům odpovídající chuť a aroma (Aoki & Uchida, 1991, Hayashida *et al.*, 1997). Počáteční stadia tradiční výroby balsamického octa taktéž vyžadují tento kvasinkový druh (Soleri & Giudici, 2008, Solieri *et al.*, 2013).

Studiem genomu haploidní *Z. rouxii* CBS 732^T bylo zjištěno, že je nositelem sedmi chromosomů o velikostech od 1.1 Mb až po 1.8 Mb a celkové velikosti 10.4 Mb. Jaderný

genom této osmotolerantní kvasinky obsahuje přibližně 5000 genů kódujících proteiny a 272 genů pro tRNA (Sherman *et al.*, 2009). Dále je známo, že *Z. rouxii* obsahuje plasmid pSR o velikosti 6.2 kb se třemi otevřenými čtecími rámci (Araki *et al.*, 1985). Zveřejnění kompletní sekvence jaderného genomu *Z. rouxii* CBS 732^T konsorciem Génolevures umožnilo rozvoj technik genomového inženýrství a tím i možnosti jejího detailnějšího studia (Sherman *et al.*, 2009, Pribylova *et al.*, 2007b, Pribylova *et al.*, 2007d). I přestože je genom kvasinky *Z. rouxii* a účinné nástroje pro práci s ní známy již řadu let, pouze několik málo genů a jejich produktů bylo kompletně charakterizováno. Patří mezi ně především přenašeče iontů (*ZrTrk1*, *ZrEna1*, *ZrSod2-22*, *ZrPma1*), cukrů (*ZrFfz1*, *ZrFfz2* a *ZrFsy1*), glycerolový kanál *ZrFps1*, enzymy podílející se na metabolismu glycerolu (*ZrGpd1*, *ZrGpd2*, *ZrGpp1*, *ZrGpp2*, *ZrGcy1*, *ZrGcy2*) a v neposlední řadě také terminální kinasa dráhy HOG, *ZrHog1* (Dakal *et al.*, 2014, Ramos *et al.*, 2011).

Podobně jako v případě dalších osmotolerantních druhů, není ani v případě *Z. rouxii* doposud známo, co stojí za její extrémní osmotolerancí. Právě odhalení specifických vlastností, které zajišťují *Z. rouxii* vysokou osmotoleranci, by mohlo pomoci pochopit obecné mechanismy a životní strategie nekonvenčních kvasinkových druhů. Následná aplikace těchto poznatků v průmyslově využívaných kmelech by pak mohla vést k významnému vylepšení výrobních postupů.

1.2.2 *Debaryomyces hansenii*

Dalším významným zástupcem skupiny osmotolerantních kvasinek je *Debaryomyces hansenii*. Podobně jako v případě ostatních diskutovaných kvasinkových druhů je i *D. hansenii* představitelkou velice heterogenní skupiny kmenů, jejichž fenotypové charakterizace se významně odlišují (Petersen & Jespersen, 2004). *D. hansenii* se často vyskytuje ve slané mořské vodě, či v koncentrovaných solných roztocích (Onishi, 1963, Norkrans & Kylin, 1969). Je schopna žít v prostředí až 4 M NaCl, na rozdíl od *S. cerevisiae*, jejíž růst je zastaven už v přítomnosti 1,7 M NaCl (Onishi, 1963). Je dokonce považována za halofilní druh, jehož růst je stimulován určitou koncentrací NaCl nebo KCl (Prista *et al.*, 1997, Thome-Ortiz *et al.*, 1998). Příčina její extrémní tolerance byla v minulosti intenzivně studována a má se za to, že jednou z hlavních příčin je schopnost akumulovat vysoké koncentrace Na⁺ bez vlivu na růst či jiné buněčné procesy (část K⁺ iontů je nahrazena právě ionty sodnými) (Prista *et al.*, 1997, Aggarwal *et al.*, 2005, Aggarwal *et al.*, 2008, Breuer & Harms, 2006). *D. hansenii* není známa jen díky své extrémní osmotoleranci, ale je také spojována s tradiční výrobou fermentovaných sýrů a masných produktů (Mounier *et al.*, 2005, Breuer & Harms, 2006, Gori

et al., 2007). Díky vysoké produkci proteolytických a lipolytických enzymů je syntetizována řada aromatických sloučenin dodávajících fermentovaným potravinám charakteristické aroma (Wyder & Puhán, 1999, Fleet & Mian, 1987). Další zajímavou vlastností *D. hansenii* je její nižší kultivační teplota. Optimální teplota se pohybuje kolem 25 °C, ale je doloženo, že tento osmotolerantní druh je schopen růst i při teplotách pohybujících se mezi 5 a 10 °C (Breuer & Harms, 2006).

Jádro haploidní *D. hansenii* CBS 767 je nositelem sedmi chromosomů o velikostech 1,25 až 2,33 Mb, přičemž celý genom má velikost 12,2 Mb (Sherman *et al.*, 2009) a jeho sekvence byla taktéž zveřejněna konsorciem Génolevures (Sherman *et al.*, 2009). Kodón CTG odpovídající v *S. cerevisiae* aminokyselině leucinu, kóduje v případě *D. hansenii* aminokyselinu serin (je tedy řazena k tzv. CTG-skupině kvasinek) a je čten unikátní tRNA-Ser (CAG), podobně jako v *C. albicans* (Sherman *et al.*, 2009, Dujon, 2010). *D. hansenii* je s kvasinkami rodu *Candida* blízce příbuzná, není však považována za patogenní druh.

1.2.3 *Pichia sorbitophila*

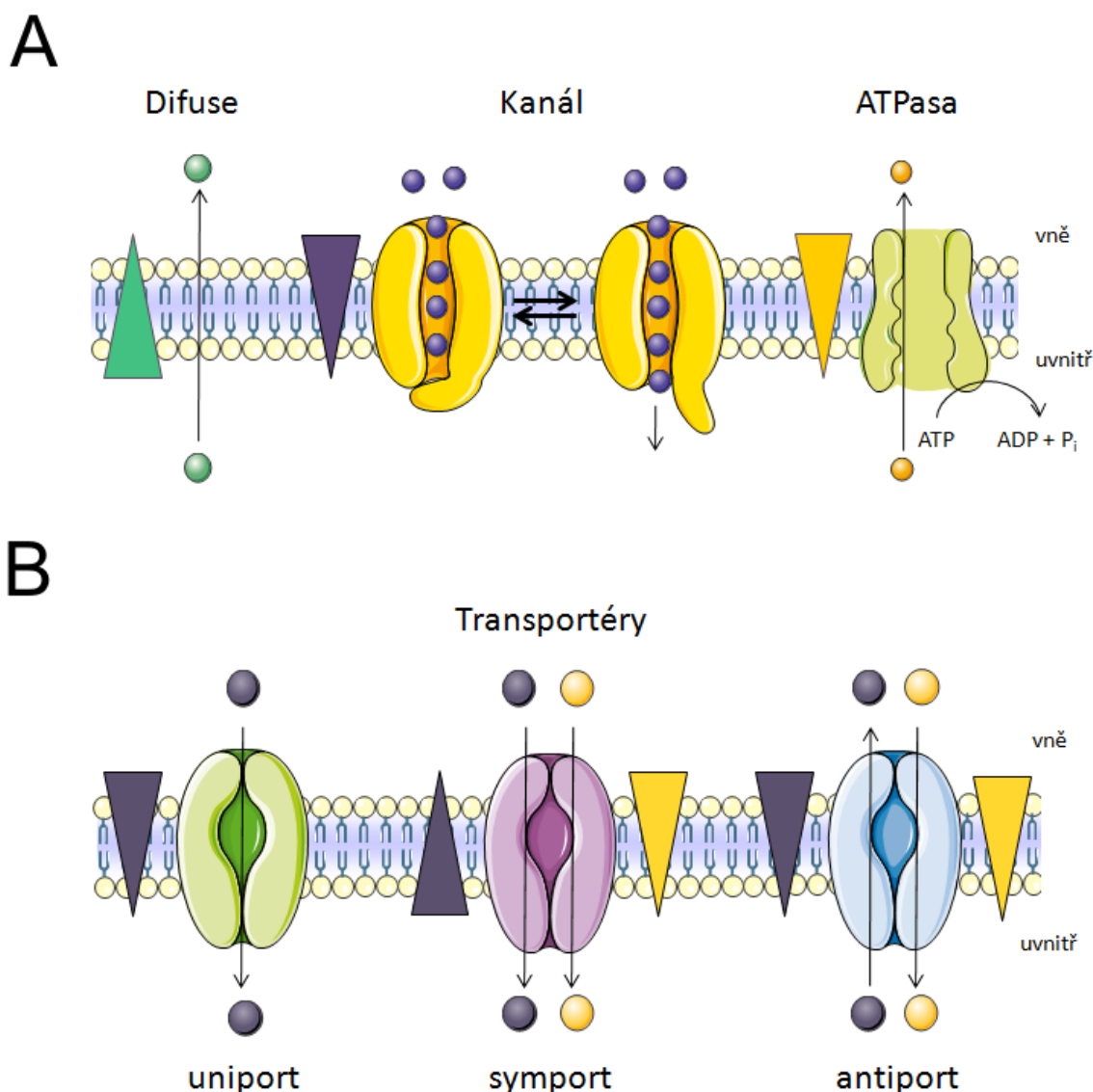
Již před více jak 30 lety byl ze 70 % roztoku sorbitolu izolován nový kvasinkový druh pojmenovaný *Pichia sorbitophila* CBS 7064 (de Miranda *et al.*, 1980). Teprve až sekvenace genomu ukázala, že se ve skutečnosti nejedná o nový druh ale o hybridní kmen příbuzný s *Pichia farinosa*. V literatuře se také můžeme setkat s platným označením *Millerozyma farinosa* (Kurtzman *et al.*, 2010).

I přestože je *P. sorbitophila* schopná žít v prostředí koncentrovaného roztoku KCl, 4 M NaCl či 0.8 M LiCl, nevykazuje známky osmofilie ani halofilie jako výše zmíněná *D. hansenii* (Lages *et al.*, 1999, Maresova & Sychrova, 2003). Roste tedy nejlépe v prostředí bez osmotického tlaku a není ani nijak náročná na dostupné zdroje energie (Maresova & Sychrova, 2003). Kompletní sekvenace jejího 21,5 Mb velkého genomu odhalila příslušnost k tzv. CTG-skupině kvasinek a také blízkou příbuznost s *D. hansenii* (de Montigny *et al.*, 2000). Diploidní *P. sorbitophila* je nositelem celkem 14 chromosomů o velikostech 1,05 až 2,12 Mb, jejichž detailní studium prokázalo, že se jedná o sedm homologních párů. Samy tyto chromosomy jsou pak mozaikou chromosomů dvou rodičovských kmenů (Louis *et al.*, 2012). Jedná se tedy o hybrid, jehož předci (rodičovské kmeny) nejsou přesně známi a bývají označovány jako P_ε a P_γ, přičemž rodičovský kmen P_γ je blízce příbuzný s *P. farinosa* CBS 2001. Z důvodu absence podobné sekvence mezi dostupnými sekvenovanými kmeny není původ druhého rodičovského kmene, tedy P_ε, doposud znám (Louis *et al.*, 2012).

1.3 Obecné mechanismy transportu látek přes plasmatickou membránu

Struktura plasmatické membrány, jakožto i ostatních membrán vyskytujících se v kvasinkových buňkách, nedovoluje volný prostup pro většinu látek. Vytváří se tak přirozená bariéra, fyzicky oddělující vnější prostředí od cytosolu. Nepropustnost membrány pro většinu molekul a iontů zajišťuje udržování jejich rozdílných koncentrací na obou stranách a stává se naprosto nezbytnou vlastností pro život buněk (Lodish *et al.*, 2012, Voet *et al.*, 2012). Buněčné membrány však neslouží pouze jako nepropustné bariéry, ale především jako prostředník mezi dvěma odlišnými prostředími. Komunikace mezi oběma stranami je zajištěna množstvím proteinů plnících řadu důležitých funkcí, jako je například komunikace mezi buňkami, signalizace, adheze k povrchům a v neposlední řadě také přenos látek (Voet *et al.*, 2012).

Přenos látek přes membrány není omezen pouze na přítomnost proteinů, některé malé molekuly mohou membránou prostupovat volně, hovoříme tedy o tzv. nezprostředkovaném přenosu neboli prosté difusi. Hnací silou je v tomto případě koncentrační gradient přenášené látky. Zprostředkovaný transport je naopak vždy vázán na přítomnost specifického proteinu neboli přenašeče a můžeme ho rozdělit na pasivní zprostředkovaný transport, tzv. usnadněnou difusi a na aktivní přenos. V případě usnadněné difuze je hnací silou stejně jako u prosté difuze koncentrační gradient přenášené látky, látka přechází z míst o vyšší koncentraci do míst, kde je její koncentrace nižší. Typickým představitelem tohoto druhu přenosu je kanál. Aktivní přenos je naopak spojen s přesunem z míst o nižší koncentraci do míst, kde je koncentrace dané látky vyšší. Tento proces však vyžaduje energii a musí být tedy spojen s procesem, při němž dochází ke spotřebě energie (Voet *et al.*, 2012, Lodish *et al.*, 2012). Aktivní přenos látek přes membrány je dále rozdělen podle hnací síly transportu, tedy na primární a sekundární. V případě primárního aktivního transportu je transport látky spojen s hydrolýzou ATP (chemická energie je přeměněna v elektro-chemickou energii). Typickými představiteli tohoto druhu přenosu jsou ATPasy transportující ionty (např. H^+ , Na^+ , Ca^{2+} , K^+). Při sekundárním aktivním transportu je energie pro transport jedné látky dodávána z elektro-chemického gradientu H^+ či jiných iontů (kombinace koncentračního gradientu a membránového potenciálu).



Obrázek 2: Mechanismy přenosu látek přes buněčné membrány. Koncentrační gradient dané látky je znázorněn pomocí trojúhelníku směřujícího z místa o vyšší koncentraci do místa, kde je koncentrace dané látky nižší. A) prostá difuze – přenos látky přes membránu ve směru koncentračního gradientu; usnadněná difuze prostřednictvím kanálu – v případě otevření kanálu se látka pohybuje také ve směru koncentračního gradientu; primárně aktivní transport ATPasou – látka prostupuje proti směru koncentračního gradientu za současné hydrolýzy ATP. B) uniport – přenos pouze jedné látky; symport – přenos dvou látek stejným směrem, pouze jedna ve směru svého koncentračního gradientu; antiport – přenos dvou látek, každá jiným směrem a pouze jedna ve směru koncentračního gradientu (Lodish *et al.*, 2012).

1.3.1 Prostá difuze

Prostá difuze odpovídá definici pasivního (tedy energii nespotřebovávajícího) prostupu látky přes dvojnou vrstvu fosfolipidů buněčné membrány. Hnací silou pro prostou difusi je rozdíl v koncentraci látky na obou stranách membrány. Dochází k přesunu z místa o vyšší koncentraci do míst s nižší koncentrací dané látky (Obrázek 2A). Úroveň a rychlost přesunu

závisí na chemické struktuře přenášené látky, fyzikálně-chemických vlastnostech membrány jako například délka postranních řetězců a úroveň saturace mastných kyselin v membráně obsažených, tekutosti membrány a jakožto i na řadě dalších faktorů (Lodish *et al.*, 2012). Vzhledem k absenci proteinu, který by přenos zprostředkoval, je tento druh transportu nesaturovatelný. Od zprostředkované difuze ho lze velice snadno odlišit díky teplotní nezávislosti (ve smyslu ovlivnění struktury proteinů teplotou), necitlivosti ke specifickým inhibitorům a jeho stimulací pomocí látek rozvolňujících strukturu membrán (Lodish *et al.*, 2012). Nejčastěji difundujícími látkami jsou plyny (O_2 , CO_2) a malé nenabitě molekuly jako například etanol.

1.3.2 Kanály

Kanály zajišťují tzv. zprostředkovanou difuzi a přenášejí vodu, specifické ionty a malé hydrofilní molekuly přes membránu ve směru jejich koncentračního nebo elektrického potenciálu. Podobně jako ostatní diskutované transportní proteiny jsou kanály tvořeny z transmembránových proteinů vytvářejících pór, kterým mohou přenášené látky volně procházet. Hlavní rozdíl oproti přenašečům je ten, že v průběhu přenosu látky přes membránu nepodstupují enzymům podobnou konformační změnu a vazebné místo pro přenášenou látku je v případě otevření kanálu dostupné z obou stran membrány (Obrázek 2A). V porovnání s prostou difuzí je transport mnohonásobně rychlejší (Lodish *et al.*, 2012). Malá část kanálů spadá do kategorie neřízených (non-gated channels), které zůstávají většinu času otevřené. Převážnou většinu však tvoří tzv. řízené kanály (gated channels) zaujímající dvě základní konformace, otevřenou a uzavřenou. Obecně platí, že dynamická rovnováha těchto dvou stavů může být ovlivněna změnami membránového potenciálu (voltage gated), vazbou ligandu (ligand gated), vnějším signálem (signal gated) nebo změnou fyzikálních vlastností membrány (Andre, 1995, Voet *et al.*, 2012).

Buněčná membrána kvasinky *S. cerevisiae* obsahuje pouze dva základní druhy kanálů. První skupinu tvoří zástupci tzv. rodiny MIP (Major Intrinsic Protein family). Nejvíce prostudovanými představiteli této rodiny jsou aquaporiny (*ScAqp1* a *ScAqp2*) a glycerolový kanál *ScFps1* (Andre, 1995, Soveral *et al.*, 2011, Tamas *et al.*, 1999). V obou případech se jedná o homotetramerní membránové proteiny, jejichž každá podjednotka obsahuje 6 α -helixů prostupujících lipidovou dvojvrstvou a dohromady vytvářející centrální pór určený pro průchod vody, glycerolu, některých iontů (As^{3+} , Sb^{3+}), apod. (Ahmadpour *et al.*, 2014, Soveral *et al.*, 2011). Druhou, neméně významnou skupinu tvoří tzv. iontové kanály. Iontové kanály využívají koncentračního gradientu vytvořeného ATPasami a umožňují transport iontů (např.

K^+ - ScTok1, Ca^{2+} - ScCch1, ScFlc2 a Cl^- - ScGef1) přes buněčnou membránu bez spotřeby energie (Arino *et al.*, 2010, Fischer *et al.*, 1997, Protchenko *et al.*, 2006, Greene *et al.*, 1993).

1.3.3 Přenašeče

Přenašeče neboli transportéry jsou podobně jako kanály představiteli tzv. zprostředkovaného přenosu látek přes membránu. Na rozdíl od kanálů mohou přenašeče transportovat látky jak pasivním, tak aktivním mechanismem. Jejich hlavní charakteristikou je mimo jiné také skutečnost, že v průběhu přenosu podstupují enzymům podobnou reversibilní konformační změnu, kdy se vazebné místo střídavě vystavuje oběma stranám membrány.

Pravděpodobně nejznámějšími zástupci skupiny přenašečů zprostředkujících tzv. usnadněnou difuzi jsou kvasinkové proteiny Hxt. Patří mezi tzv. uniportéry (Obrázek 2B), tedy přenašeče zajišťující transport pouze jedné látky. V případě transportérů Hxt se jedná o transport glukosy a některých dalších cukrů do buněk, kde jsou velice rychle metabolizovány (přenos ve směru koncentračního gradientu; Horak, 2013). Plasmatická membrána kvasinky *S. cerevisiae* obsahuje celkem 17 zástupců této skupiny a v případě *Z. rouxii* byli charakterizováni dva zástupci (ZrFfz1 a ZrFfz2) přenášející glukosu a fruktosu do buněk usnadněnou difuzí (Leandro *et al.*, 2011).

Další významnou skupinu přenašečů tvoří představitelé tzv. sekundárního aktivního transportu. Jejich aktivitou nedochází ke spotřebě energie v podobě ATP, ale ke spotřebě koncentračního gradientu jedné z transportovaných látek (H^+ , Na^+ , apod.). Řada přenašečů byla charakterizována právě v kvasinkách a na základě jejich strukturální a funkční podobnosti byly zařazeny mezi členy rodiny MFS (Major Facilitator Superfamily). Tato rodina obsahuje stovky proteinů zprostředkujících přenos nejrůznějších látek od cukrů, přes vícesytné alkoholy, aminokyseliny, ionty až po slabé kyseliny. Můžeme je rozdělit na symportéry a antiportéry (Obrázek 2B). Symportéry jsou zodpovědné za přenos dvou látek stejným směrem, přičemž jedna z nich se pohybuje proti směru koncentračního gradientu. Druhá z transportovaných látek, pohybující se ve směru koncentračního gradientu, dodává celému procesu potřebnou energii. V případě kvasinek jsou to téměř vždy protony. Symportéry jsou typicky přenašeče aminokyselin (ScGap1), vícesytných alkoholů (ScStl1), slabých kyselin (ScJen1), apod. (Andre, 1995, Pao *et al.*, 1998, Casal *et al.*, 1999, Jauniaux & Grenson, 1990, Ferreira *et al.*, 2005). Druhou skupinu přenašečů představují tzv. antiportéry. V jejich případě dochází k energetickému spřažení přenosu dvou látek podobně jako je tomu u symportu, ale s tím rozdílem, že každá z přenášených látek je transportována jiným směrem. Typickými zástupci této skupiny jsou přenašeče iontů jako například ScNha1 (Na^+/H^+),

vakuolární/endosomální ScNhx1 (Na^+/H^+) a řada dalších (Pao *et al.*, 1998, Prior *et al.*, 1996, Nass *et al.*, 1997). V genomu kvasinky *Z. rouxii* CBS 732^T byly nalezeny a charakterizovány dva homologní geny *ScNHA1* nesoucí název *ZrSOD2-22* a *ZrNHA1* (Pribylova *et al.*, 2008). V případě *D. hansenii* je detailně prozkoumán zatím pouze *DhNha1* a endosomální *DhNhx1* (Montiel & Ramos, 2007, Velkova & Sychrova, 2006).

1.3.4 ATPasy

ATPasy představují primární aktivní transport, kdy je látka přenášena přes membránu proti směru jejího koncentračního gradientu, elektrického gradientu anebo obou současně (elektro-chemického gradientu) za současné hydrolýzy ATP. Strukturálně se jedná o transmembránové proteiny s ATP-vázající doménou lokalizovanou směrem do cytosolu (Obrázek 2A). Pumpy poháněné ATP však představují velice rozmanitou skupinu proteinů, které na základě strukturálních a funkčních odlišností rozdělujeme do čtyř hlavních skupin: P-ATPasy, V-ATPasy, F-ATPasy a ABC-ATPasy (Lodish *et al.*, 2012).

Nejvýznamnější skupinou z pohledu kvasinek jsou tzv. P-ATPasy, jejichž název vychází ze skutečnosti, že v průběhu přenosu iontů je transportující doména proteinu fosforylována (odtud název P-ATPasy, z anglického *Phosphorylate*). Buňky *S. cerevisiae* jsou nositeli dvou P-ATPas, umístěných v plasmatické membráně a pumpujících H^+ ven z buňky, *ScPma1* a *ScPma2* (Serrano, 1978, Schlessner *et al.*, 1988). Zatímco *ScPma1* je pro buňky naprosto esenciální, exprese *ScPMA2* je za normálních růstových podmínek velice nízká (Schlessner *et al.*, 1988). *ScPma1* je v buňkách *S. cerevisiae* hlavním regulátorem vnitrobuněčného pH, tvůrcem membránového potenciálu a gradientu protonů využívaného sekundárně aktivními transportéry (Ferreira *et al.*, 2001). Je nerovnoměrně distribuována mezi mateřskou a dceřinou buňkou ve prospěch buňky mateřské. Nově vzniklé dceřiné buňky se vyznačují velice nízkým obsahem této významné ATPasy a současně také nižším vnitrobuněčným pH (Henderson *et al.*, 2014). Přídavek cukrů metabolizujících se v glykolýze způsobí aktivaci *ScPma1* a zvýšený výstup protonů z buňky *S. cerevisiae* (Serrano, 1983). Navenek lze tento jev pozorovat významným okyselením vnějšího prostředí. V případě osmotolerantní kvasinky *Z. rouxii* plní úlohu protonové ATPasy umístěné v plasmatické membráně protein *ZrPma1* (Watanabe *et al.*, 1991).

Další z významných kvasinkových zástupců P-ATPas je Na^+ -ATPasa nesoucí název *ScEna1* (některé kmeny *S. cerevisiae* jsou nositeli až čtyřech ATPas *Ena*; Daran-Lapujade *et al.*, 2009). Je umístěna v plasmatické membráně a má za úkol udržovat nízkou koncentraci toxických Na^+ iontů uvnitř buňky (Haro *et al.*, 1991). ATPasy s obdobnou funkcí byly

nalezeny i v kvasinkách *Z. rouxii* (ZrEna1) a *D. hansenii* (DhEna1 a DhEna2; Dakal *et al.*, 2014, Almagro *et al.*, 2001).

Vakuolární Ca^{2+} -ATPasa ScPmc1 (Cunningham & Fink, 1994), Ca^{2+} -ATPasa v membráně endoplasmatického retikula ScSpf1 (Suzuki & Shimma, 1999) a řada dalších jsou neméně významnými zástupci této skupiny ATPas kvasinky *S. cerevisiae*.

V- a F- třídy ATPas představují skupiny strukturálně velice složitých „molekulárních strojů“ přenášejících pouze protony. Zástupce V-třídy nalezneme ve vakuolárních membránách rostlin, kvasinek a hub, v endosomálních a lysosomálních membránách živočišných buněk, v plasmatických membránách osteoklastů a v některých ledvinových tubulárních buňkách. V kvasince *S. cerevisiae* jsou jednotlivé podjednotky tohoto složitého proteinu kódovány geny nesoucími označení VMA (Kane & Parra, 2000).

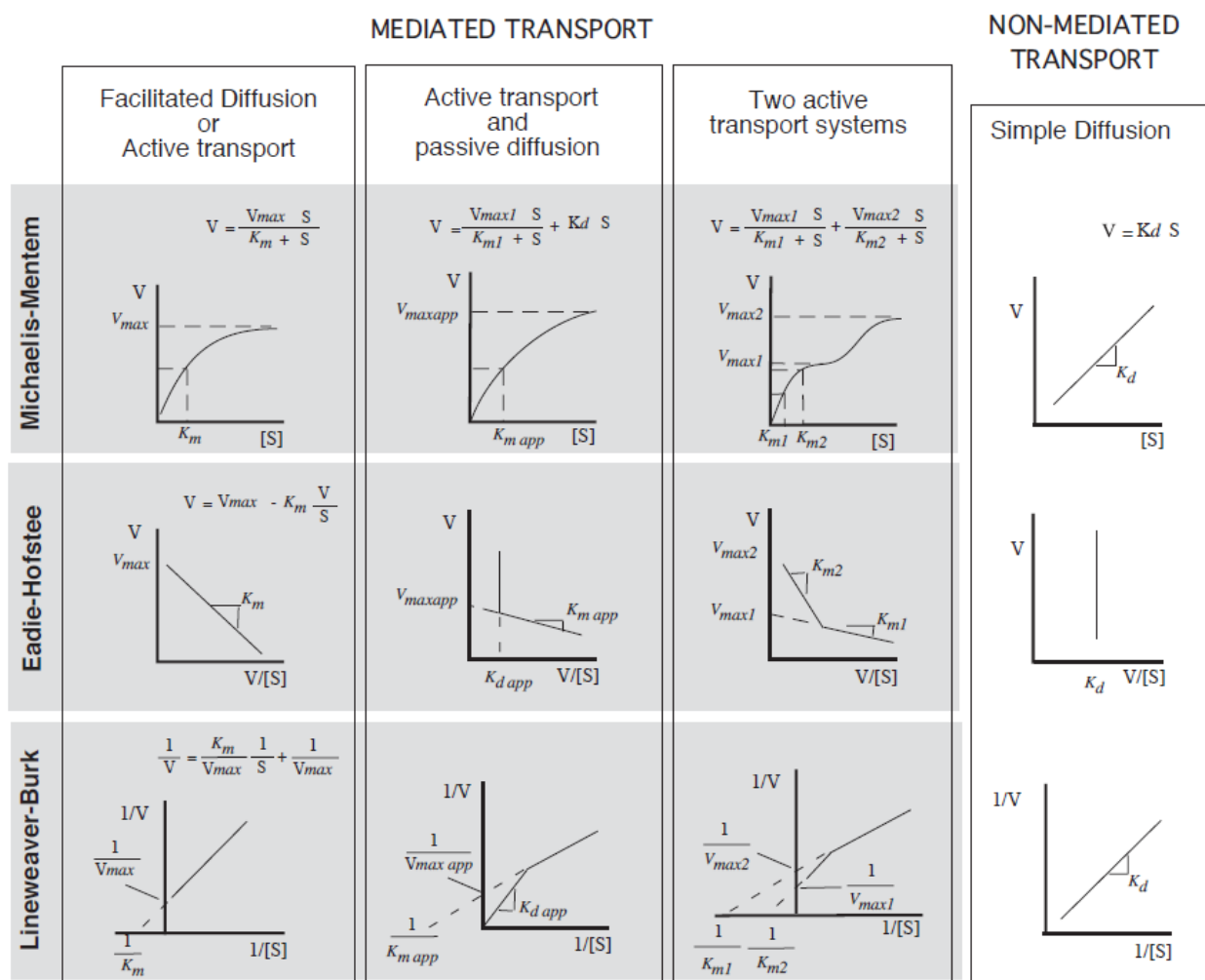
ATPasy třídy F byly nalezeny pouze v bakteriální plasmatické membráně, ve vnitřní membráně mitochondrií, thylakoidní membráně chloroplastů a na rozdíl od všech ostatních mají za úkol syntetizovat ATP, jedná se tedy o ATP-syntetasy a ne ATPasy (Lodish *et al.*, 2012, Voet *et al.*, 2012). Mitochondriální F-ATPasa kvasinky *S. cerevisiae* nese název F₁F₀-ATP-syntetasa a její jednotlivé podjednotky jsou kódovány geny ScATP (Boyer, 1997). V případě *Z. rouxii* byl nalezen a podrobně charakterizován gen ZrATP2, jehož produktem je β podjednotka mitochondriální ATP-syntetasy a jeho delece má na buňky *Z. rouxii* smrtelný účinek, na rozdíl od delece ScATP2 v *S. cerevisiae* (Watanabe *et al.*, 2003).

Poslední skupinou ATPas jsou tzv. ABC-ATPasy. Jejich název je odvozen od anglického ATP-Binding Cassette a tato skupina zahrnuje stovky transportních proteinů nalezených v membránách nejrozličnějších buněk, od bakteriálních až po živočišné. Poprvé byly popsány jako proteiny zodpovědné za resistenci rakovinných buněk k lékům (multi-drug resistant proteins), neboť transportují léky ven z nádorových buněk (Lodish *et al.*, 2012, Voet *et al.*, 2012). Kvasinky *S. cerevisiae* disponují více než 15 ATPasami tohoto typu, z nichž tři nejdůležitější (ScPdr5, ScSnq2 a ScYor1) a slouží k odstraňování toxických látek (Panwar *et al.*, 2008). Bez ohledu na substrátovou specifitu a buněčný druh, vykazují všechny ABC-ATPasy stejné strukturální znaky a to i přesto, že se jednotlivé proteiny výrazně liší v primární proteinové struktuře (Panwar *et al.*, 2008).

1.3.5 Kinetika transportu

Aktivita transportních systémů může být velice snadno graficky a matematicky znázorněna. V případě látek prostupujících membránu prostou difusí je přenos graficky znázorněn lineární závislostí, jejíž směrnice odpovídá difusní konstantě K_d (Sutherland *et al.*,

1997). Míra přenosu se odvíjí od koncentrace dané látky, ale rychlost je řízena propustností samotné membrány (Obrázek 3). Je-li k transportu látky přes membránu využito proteinu, rychlost přenosu závisí na kapacitě přenašeče, tzn. množství substrátu, které je schopné navázat se ve stejný okamžik do aktivního místa proteinu, afinitě substrátu k proteinu a na množství přenašečů umístěných v membráně. Díky těmto vlastnostem vykazuje zprostředkovaný transport enzymům podobnou kinetiku a lze ho graficky a matematicky znázornit pomocí závislosti Michaelise-Mentenové (Graca, 2004). Konstanta K_m v tomto případě odpovídá afinitě přenášené látky k transportéru, tedy specificitě daného přenašeče (čím nižší hodnota, tím vyšší afinita) a V_{max} představuje maximální rychlost systému, tedy množství látky, které může být přeneseno za jednotku času (odpovídá množství přenašeče v membráně; čím vyšší hodnota, tím větší kapacita přenosu). Závislosti podle Michaelise-Mentenové mohou být snadno linearizovány na základě úprav navržených Lineweaverem a Burkem nebo pány Eadiem a Hofsteem. Obě tyto linearizace se hojně využívají v posuzování membránového transportu a na jejich základě lze snadno odlišit, zda se na přenosu dané látky podílí více přenašečů pracujících s odlišnými K_m a V_{max} (Obrázek 3; Coons *et al.*, 1995, Fuhrmann & Volker, 1993).



Obrázek 3: Kinetika transportních mechanismů. V – počáteční rychlost přenosu, S – koncentrace látky, V_{max} – maximální rychlost přenosu, K_m – konstanta Michaelise-Mentenové, K_d – difusní konstanta. Převzato a upraveno dle (Graca, 2004).

1.4 Obecný mechanismus odpovědi buněk na stres

Definovat podmínky, které mohou být pro daný organismus stresové, není jednoduchý úkol, závisí totiž na definici podmínek nestresových. Obecně však lze říci, že za nestresové považujeme takové podmínky, které umožňují nejrychlejší možný růst, dělení buněk a udržení optimálního vnitřního složení, tedy udržení vnitřní homeostase. Z toho také vyplývá, že pro každý organismus jakožto i pro každý kvasinkový druh se obě tyto definice liší. To co pro jednu kvasinku může představovat optimální růstové podmínky, může jiným způsobovat stres neslučitelný s růstem a proliferací. Snad ještě více stresující jsou pro většinu organismů náhlé změny růstových podmínek. Účinně reagovat na tyto náhlé změny se tak stává základní vlastností všech živých organismů. V případě jednobuněčných kvasinek, které se přirozeně vyskytují v neustále se měnícím prostředí, je tato schopnost naprosto nezbytnou součástí regulace jejich metabolismu a přežití.

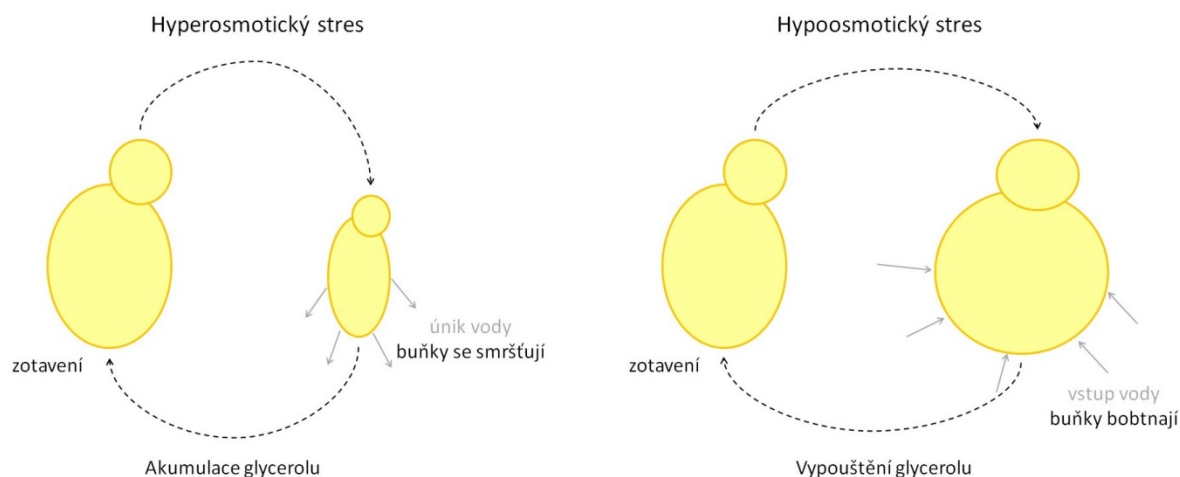
Mezi nejčastější stresy, kterými jsou kvasinky vystavovány, patří změna teploty, osmolarity, kyselosti okolního prostředí, přítomnost záření či toxických látek a v neposlední řadě také dlouhá období hladovění, kdy nejsou dostupné vhodné zdroje živin. Kvasinka *S. cerevisiae* má vyvinuté množství obranných mechanismů chránících buňku před těmito vnějšími vlivy (Estruch, 2000, Hohmann, 2002, O'Rourke *et al.*, 2002, Moye-Rowley, 2002, Mager & De Kruijff, 1995). Ve většině případů buňky využívají jakousi univerzální odpověď zahrnující indukci či represi specifických skupin genů, bez ohledu na druh stresu, kterému jsou vystaveny. Tento proces nese zkratku ESR odvozenou z anglického Environmental Stress Response (Causton *et al.*, 2001, Gasch *et al.*, 2000) a lze díky němu v kvasinkách pozorovat tzv. křížovou ochranu, což znamená, že i malá dávka určitých stresových podmínek vyvolá současnou resistenci buněk k vysokým dávkám (mnohdy smrtelným) jiného druhu stresu (Gasch, 2007, Berry *et al.*, 2011). I přestože jsou detailní mechanismy ESR známy pouze pro *S. cerevisiae*, křížová ochrana byla popsána i v jiných kvasinkových druzích jako například v *D. hansenii* (Papouskova & Sychrova, 2007). Převážná většina genů indukovaných v rámci ESR kvasinky *S. cerevisiae* je regulována pomocí transkripčních faktorů *ScMsn2* a *ScMsn4* přes tzv. elementy STRE (5'CCCCT) nacházející se v několika kopiích v regulační oblasti před daným genem (Schmitt & McEntee, 1996, Brewster & Gustin, 2014). Vystavení buněk stresovým podmínkám způsobí přesun obou transkripčních faktorů *ScMsn2* a *ScMsn4* do jádra buněk, kde navázáním na elementy STRE způsobí zvýšenou expresi genů indukovaných v rámci ESR. Jejich zpětný přesun do cytosolu a tím i zeslabení exprese daných genů je řízen protein kinasou A (PKA; Gorner *et al.*, 1998). Geny,

které jsou v rámci ESR reprimovány, se většinou podílejí na samotné syntéze proteinů. Zahrnují geny pro ribosomální proteiny, podjednotky RNA polymeras, proteiny podílející se na sestřihu a úpravě RNA, transkripční a translační faktory, ale třeba i geny řídící buněčný cyklus, metabolismus, apod. (Gasch, 2007). Současně s ESR dochází k zapojení regulačních mechanismů specifických pro daný druh stresu. Tyto mechanismy zahrnují nejen regulaci exprese určitých genů, ale třeba také změny ve struktuře proteinů (např. zavření kanálu ScFps1 při hyperosmotickém šoku, aktivace ScNha1 transportéru a ScTok1 kanálu taktéž v průběhu hyperosmotického šoku, apod.; Proft & Struhl, 2004, Ahmadpour *et al.*, 2014) a jsou dohromady s ESR zodpovědné za celkovou podobu odpovědi buněk na daný stres.

1.4.1 Homestase vody

Nejčastěji se vyskytující změnou okolního prostředí, které jsou kvasinky vystavovány, je změna vodní aktivity (a_w). Aktivita vody je definována jako chemický potenciál volné vody v roztoku a pohybuje se v rozmezí od 0 do 1, kdy hodnota blíží se 1 odpovídá velmi zředěnému roztoku ($a_w = 1$ platí pro čistou vodu). Dramatické změny v koncentraci rozpuštěných látek v médiu (tedy změny a_w) způsobují kvasinkám osmotický stress. V návaznosti na tyto změny dochází ke změnám a_w uvnitř buněk a následnému narušení rovnováhy biochemických procesů probíhajících v buňce (Hohmann, 2002). V případě zvýšení osmolarity média (snížení a_w ; hyperosmotický stres), proudí voda z buněk ven ve směru svého koncentračního gradientu, což má za následek zmenšení buněčného objemu a zvýšení koncentrace všech látek, které se v buňkách vyskytují. Naopak snížení koncentrace osmoticky aktivních látek v okolním prostředí (hypoosmotický stres) způsobí zvýšení průniku vody do buněk a tím i jejich bobtnání a naředění vnitrobuněčného obsahu (Obrázek 4; Csonka & Hanson, 1991, Blomberg & Adler, 1992, Hohmann & Mager, 2003). Nezastupitelnou roli v přežití náhlých změn ve vnější aktivitě vody hraje malá molekula glycerolu. Působí coby vnitřní osmolyt a napomáhá tak buňkám vyrovnat se změnami osmotického tlaku v okolí (úloha a metabolismus glycerolu je detailně diskutována dále). V případě, že buňky nejsou schopny přizpůsobit se nastalým podmínkám, dochází k zastavení buněčného cyklu, rozvratu metabolismu a následné smrti (Hohmann, 2002).

V předkládané dizertační práci je popsán mechanismus odpovědi na hyperosmotický stres platný pro *Saccharomyces cerevisiae*. Jedná se však o obecné principy, které se pravděpodobně uplatňují i u jiných kvasinkových druhů (jak bylo již v řadě případů prokázáno), a mohou být nejrůzněji přizpůsobeny prostředí, ve kterém se daný kvasinkový druh vyskytuje.



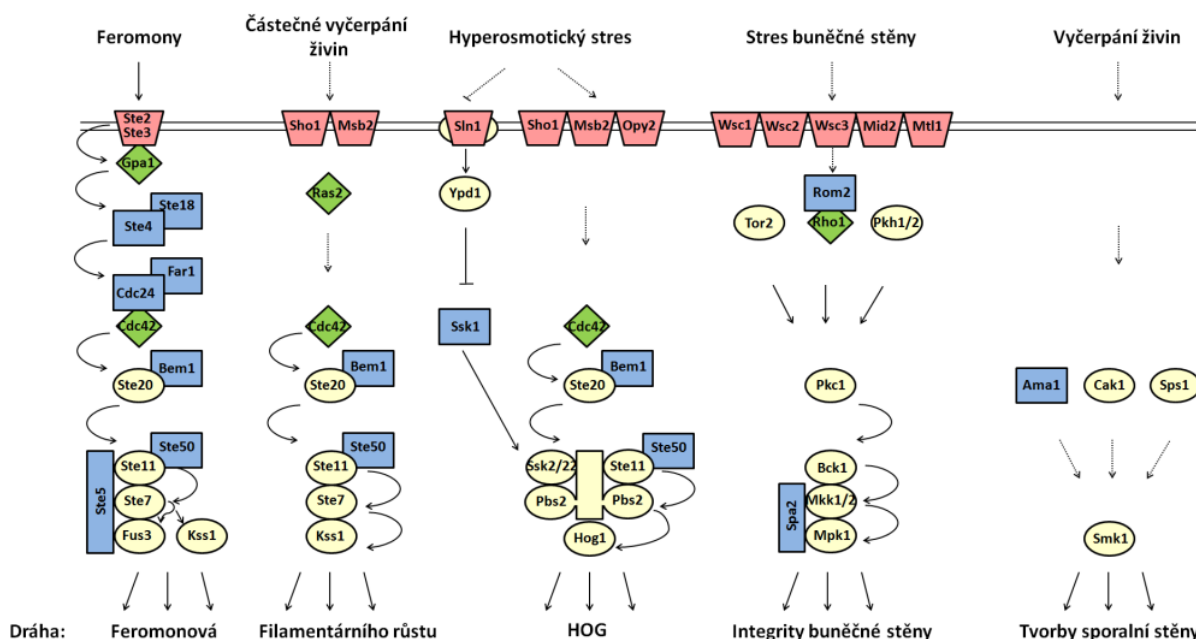
Obrázek 4: Osmotická homeostase v kvasince *S. cerevisiae*. V případě hyperosmotického stresu putuje voda z buněk ven ve směru koncentračního gradientu a dochází ke smršťování buněk, tedy zmenšení jejich buněčného objemu. Odpovědí buňky je uzavření/inaktivace kanálu ScFps1, zvýšení produkce a vstupu glycerolu do buněk. Tím dojde k obnovení turgoru (tlak na buněčnou stěnu obklopující plasmatickou membránu kvasinek), a buněčného objemu. Hypoosmotické podmínky naopak způsobí vstup vody do buněk a jejich bobtnání. Okamžité otevření/aktivace kanálu ScFps1 zajistí dostatečný výstup glycerolu a tím i snížení turgoru a buněčného objemu. Upraveno dle (Ahmadpour *et al.*, 2014).

1.4.2 Signální dráhy MAPK v kvasinkách

Všechny buňky, včetně kvasinek, využívají signální dráhy k monitorování jak vnějších, tak vnitřních podnětů a k odpovědi na ně. Nejdůležitější signální drahou v kvasinkách je kinasová kaskáda MAP (Mitogen Activated Protein kinase cascade). Všeobecně uznávaná funkční jednotka kinasové dráhy MAP je tvořena třemi postupně se zapojujícími kinasami, MAP-kinasa kinasa kinasa (MAPKKK), MAP-kinasa kinasa (MAPKK) a MAP-kinasa (MAPK) (Widmann *et al.*, 1999). Na vrcholu řetězce se nachází MAPKKK obsahující C-terminální serin-threoninovou kinasovou doménu, která při aktivaci fosforyluje dva serinové nebo threoninové zbytky MAPKK. MAPKK mají dvojí specifitu účinku (serin-threoninovou a také tyrosinovou kinasovou aktivitu) a fosforylují threoninové nebo tyrosinové zbytky konzervovaných motivů umístěných v aktivační smyčce MAPK. Tyto MAPK jsou v průběhu fosforylace často přenášeny z cytosolu do jádra a fosforylují rozmanitý soubor substrátů, kterými jsou například transkripční faktory, regulátory translace, enzymy ale i další skupiny proteinů umístěných v cytosolu. Z tohoto úhlu pohledu lze říci, že MAPK mají široké spektrum účinku, neboť kontrolují expresi genů, metabolismus, buněčný cyklus, růst a morfogenesi buněk (Widmann *et al.*, 1999, Chen & Thorner, 2007, Schwartz & Madhani, 2004). Nevhodná aktivace kinasové dráhy MAP má obecně škodlivý účinek a

z toho důvodu je její aktivace přísně regulována (Martin *et al.*, 2005). Jelikož je k aktivaci dráhy vyžadována fosforylace, jako jediný účinný prostředek inaktivace je tedy defosforylace proteinovými fosfatasami se serin-threoninovou (ScPtc1, ScPtc2 a ScPtc3), tyrosinovou (ScPtp2 a ScPtp3) či kombinovanou aktivitou (ScMsg5 a ScSdp1; Martin *et al.*, 2005, Chen & Thorner, 2007).

Je známo, že genom kvasinky *S. cerevisiae* kóduje celkem čtyři MAPKKK (ScSte11, ScBck1, ScSsk2 a ScSsk22), čtyři MAPKK (ScSte7, ScMkk1, ScMkk2 a ScPbs2), šest MAPK (ScFus3, ScKss1, ScSlt2/Mpk1, ScSmk1, ScHog1 a YKL161C), mezi kterými ovšem pouze ScHog1, ScFus3, ScKss1 a ScSlt2 jsou považovány za skutečné MAPK. Toto relativně omezené množství signálních elementů, využívaných v odpovědi buněk na velké množství podnětů, vede k jejich zapojování v několika signálních drahách. To může teoreticky způsobit tzv. křížovou aktivaci (cross-talking), kdy dojde k aktivaci nesprávné níže položené dráhy na daný podnět. Nicméně i přes tuto skutečnost je specifická účinku na daný druh podnětu striktně dodržována (Schwartz & Madhani, 2004, McClean *et al.*, 2007). Specifická účinku je dosažena s využitím několika mechanismů: 1) fyzické oddělení společných elementů; 2) kombinovaný signál (shoda dvou různých vstupů nezbytná pro aktivaci dané dráhy); 3) křížová inhibice dráhy a 4) kinetika (průběh, rozsah aktivace a odpovídající intenzita signálu, tedy faktory, které jsou částečně řízeny kontrolním fosforylačním postavením MAPK; Schwartz & Madhani, 2004, Martin *et al.*, 2005).



Obrázek 5: Schématický diagram MAP-kinasových signálních drah v *S. cerevisiae*. Symboly: proteinové kinasy, ovály; konstrukční, adaptorové a aktivační proteiny, obdélníky; proteiny vázající GTP, kosočtverce; membránové proteiny, lichoběžníky; aktivace, šipky; inhibice, útvary \perp ; přímá aktivace, hladké šipky; nepřímá aktivace či neznámý mechanismus, přerušované šipky a útvary \vdash . Zobrazeny jsou pouze nejdůležitější faktory a interakce, přímé cíle MAP-kinas nejsou zobrazeny. Přepřacováno a upraveno dle (Chen & Thorner, 2007).

S. cerevisiae disponuje celkem pěti signálními kinasovými drahami MAP (Obrázek 5), z čehož pouze čtyři jsou detailně prostudovány. MAP-kinasa (MAPK) zodpovědná za odpověď buněk na přítomnost feromonů v prostředí se nazývá ScFus3 a je součástí tzv. feromonové dráhy (Mating pheromone response pathway). Aktivace kinasy ScFus3 vede k expresi řady specifických genů; zastavení buněčného cyklu; polarizaci buněk (tvorba tzv. „shmoo“ – protažení buněk směrem k výskytu feromonu, snaha o růst směrem k párovacímu partnerovi); změnám v kompozici plasmatické membrány a buněčné stěny, které umožní spojení s další buňkou; dále také změny v jaderném obale, usnadňující spojení dvou haploidních jader (Chen & Thorner, 2007, Merlini *et al.*, 2013). K aktivaci této buněčné mašinerie dochází tehdy, octne-li se haploidní kvasinková buňka (*MATa* nebo *MATα*) v přítomnosti feromonu produkovaného opačným párovacím typem (*MATa* produkují *a*-faktor, *MATα* pak produkují *α*-faktor). *a/α*-faktor, neboli kvasinkové feromony, jsou krátké peptidy dlouhé několik aminokyselin vázající se na membránové receptory buněk opačného párovacího typu. Výsledkem aktivace a následného párování je tedy diploidní kvasinková buňka (*MATa/MATα*).

Vyskytne-li se *S. cerevisiae* v prostředí s vysokou koncentrací živin, životní cyklus je rychlý a kvasinky se dělí pučením. Dceřiné buňky se od mateřské haploidní buňky oddělují vždy na stejném pólu (tzv. axiální pučení). Diploidní buňky na rozdíl od haploidních vykazují v přibližně 50 % případů tzv. bipolární pučení, což znamená, že dceřiná buňka se od mateřské odděluje na opačném pólu buňky (Chen & Thorner, 2007). V případě vyčerpání zdrojů živin, především zdrojů dusíku, dochází u kvasinek k morfologické změně, která má za následek prodloužení buněk a unipolární růst, kdy se dceřiná buňka vytváří vždy pouze na opačném konci vzniku buňky mateřské. Ve většině případů nedochází ani k samotnému oddělení jednotlivých buněk. Současně se buňky vyznačují zvýšenou adhezí k ostatním buňkám, k povrchu a také schopností penetrace do substrátu. Všechny tyto změny se souhrnně nazývají invazivní (haploidní buňky)/pseudohyfální (diploidní buňky) růst a je za ně zodpovědná signální dráha filamentárního růstu (Filamentous growth pathway). Dráha, jejíž terminální kinasa se nazývá *ScKss1*, a sdílí velké množství komponent s feromonovou signální drahou (Obrázek 5; Widmann *et al.*, 1999, Schwartz & Madhani, 2004, Chen & Thorner, 2007).

Dojde-li k vyčerpání jak zdrojů uhlíku, tak dusíku, diploidní buňky podstupují meiotické dělení a vytváří čtyři haploidní spory. Spory jsou speciální buněčné útvary, které buňkám umožňují přežít nepříznivé období. Díky velice odolné stěně a obecně výjimečnému vnitřnímu metabolismu se spory vyznačují extrémní tolerancí k vysychání, teplotám a obecně k nejrůznějším druhům stresu. MAP-kinasa *ScSmk1* je vyžadována právě pro formování sporální stěny a její nefunkčnost v diploidních buňkách způsobí poruchu tvorby spor (Huang *et al.*, 2005, Chen & Thorner, 2007). Celý průběh této dráhy včetně MAPKKK a MAPKK prozatím není znám.

Další z řady MAP-kinasových drah je dráha integrity buněčné stěny, tzv. dráha CWI (Cell Wall Integrity pathway = CWI pathway). CWI podobně jako níže popisovaná dráha HOG odpovídají na změny osmolarity vnějšího prostředí (Hohmann & Mager, 2003). Na rozdíl od dráhy HOG, která je aktivována v případě hyperosmotického stresu, dráha CWI je rychle a přechodně aktivována v případě poklesu osmolarity prostředí (Levin, 2011, Levin, 2005). Obecně lze říci, že dráha CWI je aktivována ve všech případech, kdy dochází k tlaku na strukturu kvasinkové buněčné stěny. Kromě hypoosmotických podmínek je to dále působení glukanas (např. enzym zymolyasa), vystavení látkám vázajícím se na chitin buněčné stěny (např. Caucofluor white, Congo red), oxidativní stres, depolarizace cytoskeletárního aktinu a v neposlední řadě také feromony indukovaná morfogenese (Levin, 2005, Harrison *et al.*, 2004). Terminální kinasou této dráhy je *ScSlt2*, jejíž aktivace má za následek změnu

exprese řady genů. Produkty těchto genů jsou především proteiny buněčné stěny, nebo se podílejí na její tvorbě (Jung & Levin, 1999).

Pátou a tedy poslední signální MAP-kinasovou dráhou je dráha HOG (High Osmolarity Glycerol pathway). Vzhledem k její důležitosti v odpovědi na hyperosmotický stres je detailně probrána v samostatné kapitole.

1.4.3 Signální dráha HOG

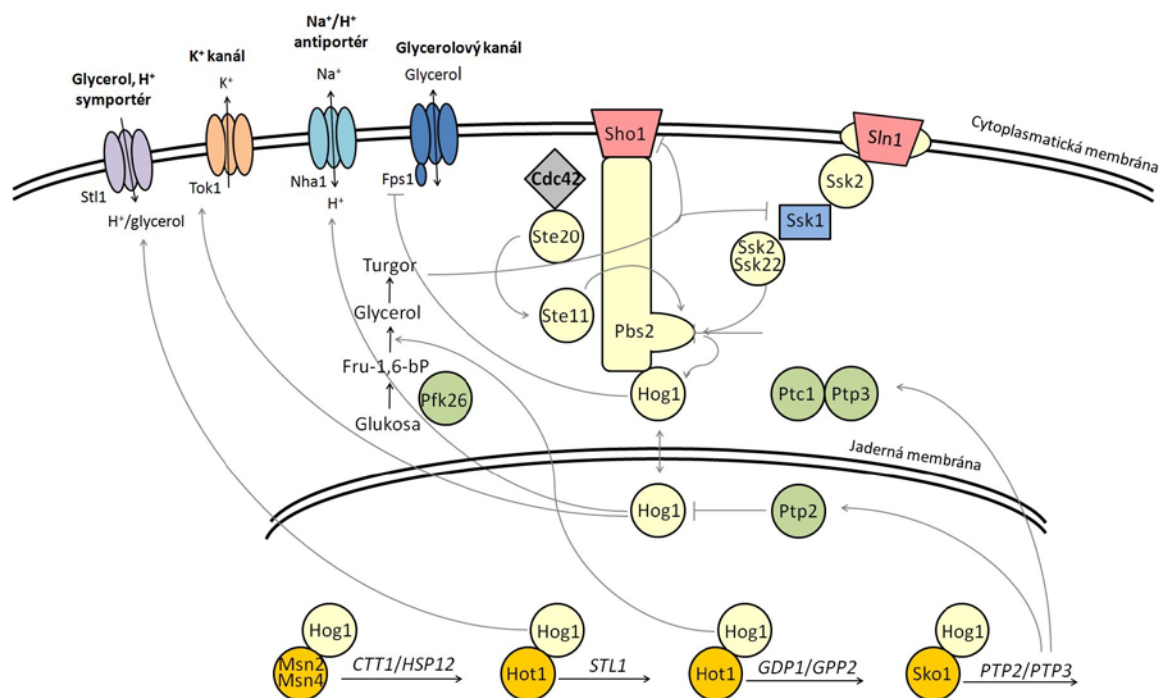
Dráha HOG zprostředkovává odpověď buněk na hyperosmotický stres a její nejvýznamnější funkcí je regulování akumulace glycerolu (Hohmann, 2002, Hohmann, 2009, Saito & Posas, 2012). Centrální protein této dráhy se v případě kvasinky *S. cerevisiae* nazývá kinasa ScHog1, byla objevena již před více než dvaceti lety a má své dva ortology také v savčích buňkách (p38, JNK = c-Jun N-terminální kinasa; Brewster *et al.*, 1993, Han *et al.*, 1994, Galcheva-Gargova *et al.*, 1994, Brewster & Gustin, 2014). Její přítomnost byla prokázána i v řadě dalších kvasinek jako například v *C. albicans* (San Jose *et al.*, 1996), *Sch. pombe* (Kato *et al.*, 1996), *D. hansenii* (Bansal & Mondal, 2000) nebo třeba v *Z. rouxii* (Iwaki *et al.*, 1999).

Dráha HOG kvasinky *S. cerevisiae* je složena ze dvou nezávisle fungujících větví, tzv. větve Sln1 a větve Sho1, které se setkávají v MAPKK-kinase ScPbs2. Část dráhy Sln1 obsahuje „histidin-aspartát-fosfát přenášející“ systém, který byl objeven i u bakterií a je tedy konzervován jak mezi eukaryoty, tak mezi prokaryoty (Posas *et al.*, 1996). Fosfát se v této části dráhy HOG přenáší mezi třemi elementy, kterými jsou ScSln1, ScYpd1 a ScSsk1 (obrázky č. 5 a 6). ScSln1 plní úlohu senzoru lokalizovaného v plasmatické membráně, obsahuje mimobuněčnou senzorkou doménu, dvě plasmatické domény, histidin-kinasovou a přijímací. Při nestresových podmínkách je protein ScSln1 aktivní, zatímco hyperosmotický stres způsobí jeho inaktivaci (Posas & Saito, 1998). Za normálních růstových podmínek, tedy v aktivním stavu, je ScSln1 autofosforylován na His576, tento fosfát je dále přenesen na Asp1144 téhož proteinu a následně na His64 proteinu ScYpd1. ScYpd1 okamžitě přenáší získanou fosfátovou skupinu na Asp554 regulačního ScSsk1 (Posas *et al.*, 1996). Tato fosforylace zabrání interakci ScSsk1 s MAPKKK-kinasami ScSsk2 a ScSsk22 (Posas & Saito, 1998, Saito & Posas, 2012). V případě, že se kvasinky ocitnou v prostředí s vysokou koncentrací osmoticky aktivních látek, je celý tento Sln1-Ypd1-Ssk1 systém neaktivní, ScSsk1 se váže na regulační domény ScSsk2 a ScSsk22, tím dochází k jejich fosforylaci a současně aktivaci (Saito & Tatebayashi, 2004).

Signální větev Sho1 začíná dvěma transmembránovými osmoreceptory mucinového typu, *ScMsb2* a *ScHkr1* (Tatebayashi *et al.*, 2007). Jejich vysoce glykosylovaná část (mucinová doména) spojuje vnitřek buňky s mimobuněčným prostorem a může tak monitorovat změny mezi buněčnou stěnou a plasmatickou membránou (Hohmann, 2009). V návaznosti na hyperosmotický stres, MAPKK-kinasa *ScPbs1* se spojí s plasmatickou membránou a současně se také dostane do kontaktu s proteinem *ScSte11*, resp. kinasami *ScSte20* a *ScCla4*. Tyto dvě kinasy jsou asociovány s G-proteinem *ScCdc24* a způsobí fosforylaci (aktivaci) *ScSte11* (Hohmann, 2009, Tatebayashi *et al.*, 2007).

Aktivní *ScSsk2*, *ScSsk22* a *ScSte11* fosforylují výše několikrát zmíněnou MAPKK-kinasu *ScPbs2*. *ScPbs2* obratem fosforyluje centrální MAP-kinasu dráhy HOG, tedy protein *ScHog1*.

V průběhu hyperosmotického stresu je každá z těchto dvou větví schopna nezávislé aktivace *ScHog1*. Ale i přesto, větev *Sln1* hraje při aktivaci prominentní roli a je schopna aktivace již při relativně malé změně osmotického tlaku na rozdíl od části Sho1, která sehrává svoji úlohu především v koordinaci signálů dráhy HOG a jiných signálních drah MAPK (Elion *et al.*, 2005, Hohmann, 2009). Tím se dá také vysvětlit, proč má *S. cerevisiae* dvě zdánlivě zdvojené větve též signální dráhy. Aktivovaný, tedy fosforylovaný *ScHog1* je transportován do jádra buňky, kde ovlivňuje transkripční faktory (*ScHot1*, *ScSko1*, *ScMsn2/4*, *ScMsn1* a *ScSmp1*) a následně i expresi jimi regulovaných genů (Hohmann *et al.*, 2007). *ScHot1* je hlavní aktivátor genů účastnících se metabolismu glycerolu, ať již na úrovni jeho syntézy přes geny *ScGPD1/GPD2*, anebo na úrovni transportu, kdy aktivuje expresi genu *ScSTL1* jehož produkt zajišťuje transport glycerolu do buněk. *ScMsn2* a *ScMsn4* jsou duplicitní transkripční faktory nacházející uplatnění v obecné odpovědi buněk na stres (ESR) a jejich jaderné umístění je negativně ovlivňováno protein kinasou A (Ruis & Schuller, 1995). Transkripční faktor *ScSko1* podporuje expresi *ScMsn2*, podobně jako některých dalších regulátorů zapojených v odpovědi na hyperosmotický stres (Hohmann *et al.*, 2007, Proft *et al.*, 2005).



Obrázek 6: Detailní popis dráhy HOG včetně toku informací v *S. cerevisiae*. Dráha HOG obsahuje dvě větve, Sln1 a Sho1, které se scházejí ve společné MAPKK ScPbs2. V průběhu aktivace, ScPbs2 fosforyluje kinasu ScHog1. ScHog1 má své cíle současně v jádře a také cytosolu. Těmi cytosolovými jsou ScNha1, ScTok1, ScFps1 a ScStt1. ScHog1 dále stimuluje glykolysu aktivací ScPfk26. Symboly: inhibice, útvary ⊥; aktivace, šipky. Přepřacováno dle (Hohmann *et al.*, 2007).

Kinasa ScHog1 neovlivňuje pouze jaderné proteiny a expresi genů, ale má také velké množství cílů v cytosolu. Těmi jsou například Na^+/H^+ antiporter ScNha1, draselný kanál ScTok1 (Proft & Struhl, 2004, Saito & Posas, 2012), proteinové kinyasy ScRck1 a ScRck2 podílející se na odpovědi buněk na osmotický a oxidativní stres, a v neposlední řadě také inhibitor cyklin-dependentní proteinové kinyasy ScSic1, naznačující, že část aktivovaného ScHog1 zůstává v cytosolu i přes jeho zjevnou jadernou lokalizaci (Elion *et al.*, 2005, Bicknell *et al.*, 2010).

Jedním z účinků aktivní kinyasy ScHog1 je inhibice buněčného cyklu, což by mělo v případě konstitutivní aktivace v konečném důsledku za následek buněčnou smrt (Maeda *et al.*, 1993, Escote *et al.*, 2004, Adrover *et al.*, 2011). I letální účinek nadprodukce některých komponent dráhy HOG je způsoben zvýšenou aktivací kinyasy ScHog1 (Krantz *et al.*, 2009). Z tohoto důvodu musí mít buňky vyvinutý účinný mechanismus negativní regulace ScHog1 v případě, že hyperosmotický stres již odezněl. Nejdůležitějším zpětně-vazebným mechanismem signální dráhy HOG je odstranění projevů osmotického stresu indukovanou akumulací glycerolu (Brewster *et al.*, 1993, Albertyn *et al.*, 1994, Klipp *et al.*, 2005, Muzzey *et al.*, 2009). Transkripční indukce ScGPD1 a dalších genů nutných pro syntézu glycerolu je

důležitá především z dlouhodobého hlediska adaptace na hyperosmotický stres (Hirayama *et al.*, 1995). Má se tedy za to, že okamžitá změna akumulace glycerolu je způsobena především přímým vlivem kinasy ScHog1 na aktivitu kanálu ScFps1 a enzymů syntézy glycerolu (Dihazi *et al.*, 2004, Klipp *et al.*, 2005, Mollapour & Piper, 2007, Westfall *et al.*, 2008, Beese *et al.*, 2009, Bouwman *et al.*, 2011). Úroveň fosforylace proteinu ScHog1 je dále také řízena množstvím fosfatů, zahrnujících výše zmíněné tyrosinové ScPtp2 a ScPtp3 (Mattison & Ota, 2000) a serinové fosfatasy ScPtc1, ScPtc2 a ScPtc3 (Warmka *et al.*, 2001, Hohmann, 2009), (Obrázky 5 a 6). Přestože defosforylace kinasy ScHog1 fosfatami hraje velmi důležitou úlohu v regulaci její funkce, matematické modely a simulace ukázaly, že pouze samotná defosforylace nemůže mít za následek celý proces buněčné osmoadaptace. Má se za to, že právě adaptace na hyperosmotický stres určuje časový rámec aktivace HOG dráhy. Například buňky zvýšeně exprimující gen *ScGPD1*, tedy buňky se zvýšenou produkcí glycerolu, vykazují kratší dobu aktivace dráhy HOG (Krantz *et al.*, 2004). Ocitnou-li se buňky v prostředí s mírným osmotickým stresem, kdy je potřeba jen malé množství glycerolu, dojde k inaktivaci dráhy HOG již po pěti minutách. Na druhou stranu, prostředí s velmi vysokou koncentrací osmoticky aktivních látek, kdy je třeba akumulace velkého množství glycerolu, způsobí její prodlouženou aktivaci (Pelet *et al.*, 2011). Relativně dlouhá doba aktivity kinasy ScHog1 byla zaznamenána i v případě mutantních kmenů neschopných účinné akumulace glycerolu, jako například kmeny se zkrácenou verzí glycerolového kanálu ScFps1 (buňky produkují kanál ScFps1, který je stále otevřen; Siderius *et al.*, 2000, Klipp *et al.*, 2005). Nicméně je důležité si připomenout, že ScHog1 vykazuje jistou bazální aktivitu závislou na větvi Sln1 (Macia *et al.*, 2009).

Kinasa ScHog1 je také zahrnuta v odpovědi na různé jiné podněty, přestože charakter těchto odpovědí se značně liší. Dráha HOG odpovídá na přítomnost kyseliny octové (Mollapour & Piper, 2007), citrónové (Lawrence *et al.*, 2004), na chlad (Hayashi & Maeda, 2006, Panadero *et al.*, 2006), teplo (Winkler *et al.*, 2002), nízké pH vnějšího prostředí (Kapteyn *et al.*, 2001), hypoxii (Hickman *et al.*, 2011), inhibici syntézy glykosylfosfatidylinositolové kotvy (GPI; Toh-E & Oguchi, 2001), inhibici syntézy sfingolipidů (Tanigawa *et al.*, 2012) a v neposlední řadě také na oxidativní stres (Bilsland *et al.*, 2004). Díky aktivaci kinasy ScHog1 v případě, kdy jsou buňky vystaveny iontům arsenu, přispívá dráha HOG také k toleranci buněk vůči těmto toxickým iontům (Thorsen *et al.*, 2006, Sotelo & Rodriguez-Gabriel, 2006). Ve většině výše zmíněných případů je ScHog1 pouze mírně aktivována a i kinetika fosforylace se liší v porovnání s odpovědí na osmotický stres.

Obecně lze říci, že každá jednotlivá dráha MAP je víceméně aktivována specifickým podnětem a indukuje tak specifickou odpověď na daný stimul. Absolutní specifity účinku by bylo snadno dosaženo v případě, kdyby každá z drah byla složena pouze z jedinečných součástí. Dráha HOG však sdílí některé kinasy a fosfatasy i s dvěma dalšími kinasovými drahami MAP (feromonová dráha a dráha filamentárního růstu), čímž se vytváří řada uzlů pro interakci těchto drah (Obrázek 5). Zabránění úniku signálu a tzv. křížové aktivaci, mezi jednotlivými drahami je dosaženo negativní regulací zahrnující fosfatasy (Saito, 2010, Saito & Posas, 2012, Brewster & Gustin, 2014). Ale i přes tuto regulaci, v případě mutace genů *ScHOG1* nebo *ScPBS2* a současného působení hyperosmotického stresu, byla prokázána křížová aktivace mezi těmito třemi drahami, která měla za následek tvorbu „shmoo“ a psedohyfální růst, tedy morfologické změny, které jsou důsledkem aktivace feromonové signální dráhy a dráhy filamentárního růstu (Davenport *et al.*, 1999, Hall *et al.*, 1996, O'Rourke & Herskowitz, 1998, Brewster & Gustin, 2014).

1.5 Funkce vnitřních osmolytů

K základním fyziologickým pochodům živých buněk patří udržování vyšší vnitrobuněčné koncentrace rozpuštěných látek, které je spojeno s vyšším vnitrobuněčným tlakem v porovnání s okolním prostředím. Buněčná stěna obklopující plasmatickou membránu kvasinek však klade odpor tomuto vnitřnímu tlaku, čímž vzniká tzv. buněčný tlak neboli turgor. V případě změny koncentrace osmoticky aktivních látek v okolí, přizpůsobují buňky vnitřní osmolaritu právě tak, aby vždy zůstal zachován buněčný turgor (Obrázek 4; Wood, 1999, Blomberg & Adler, 1989, Hohmann *et al.*, 2007, Westfall *et al.*, 2008, de Nadal *et al.*, 2011). Jedním z mechanismů přizpůsobení se vysoké osmolaritě v okolním prostředí je akumulace tzv. vnitřních osmolytů. Jejich hlavním úkolem je zvýšení vnitrobuněčného osmotického tlaku, tedy snížení a_w na takovou úroveň, že voda začne zpětně putovat do cytosolu a dojde tak k obnově vnitřního tlaku (Hohmann, 2009). Další úlohou akumulace vnitřních osmolytů je ochrana biomolekul před poškozením a zachování buněčných procesů.

Akumulace vnitřních osmolytů je fenomén vyskytující se jak u bakterií, rostlin, živočišných buněk, tak mezi kvasinkami, a jejich forma se tedy velice liší, počínaje ionty, aminokyselinami a jejich deriváty, přes vícesytné alkoholy, cukry, methylaminy až po močovinu (Yancey, 2005, Yancey *et al.*, 1982). Některé organismy využívají pouze jeden druh osmolytu, jiné naopak kombinují různé molekuly k dosažení ideálního vnitřního prostředí. Mezi kvasinkami jsou nejvíce rozšířeny vícesytné alkoholy neboli polyoly, ale i tak jsou velké rozdíly co do jejich využití jednotlivými druhy (viz. Tabulka 1).

Tabulka 1: Využití jednotlivých vícesytných alkoholů coby vnitřních osmolytů vybranými organismy. Tučně vyznačené alkoholy představují preferovaný osmolyt pro daný organismus.

Organismus	Akumulovaný vícesytný alkohol	Reference
Řasy		
<i>Dendryphiella salina</i>	Manitol , arabitol, glycerol, erytritol	Wethered <i>et al.</i> (1985)
<i>Dunaliella spp.</i>	glycerol	Brown (1976)
Vláknité houby		
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Manitol, glycerol , arabitol, erytritol	Gadd <i>et al.</i> (1984), Witteveen and Visser (1995)
<i>Aspergillus niger</i>		
<i>Geotrichum a Endomyces spp.</i>	Arabitol , manitol	Dacosta and Niederpruem (1980), Luxo <i>et al.</i> (1993)
Kvasinky		
<i>Candida cacaoi</i>	Glycerol , arabitol	Van Eck <i>et al.</i> (1993)
<i>Candida glycerinogenes</i>	Glycerol , arabitol	Zhuge <i>et al.</i> (2001)
<i>Candida magnoliae</i>	Glycerol, manitol	Van Eck <i>et al.</i> (1993)
<i>Candida sake</i>	Glycerol, arabitol, manitol, erytritol	Abadias <i>et al.</i> (2001)
<i>Candida tropicalis</i>	Glycerol	Garcia <i>et al.</i> (1997)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Glycerol , arabitol, ribitol	Adler and Gustafsson (1980), Larsson <i>et al.</i> (1990), Meikle <i>et al.</i> (1991)
<i>Pichia anomala</i>	Glycerol, arabitol, erytritol, manitol	Parekh and Pandey (1985)
<i>Pichia farinosa</i>	Glycerol , arabitol, erytritol	Hootmann <i>et al.</i> (1991)
<i>Pichia sorbitophila</i>	Glycerol , arabitol	Van Eck <i>et al.</i> (1993)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glycerol	Edgley and Brown (1978), Olz <i>et al.</i> (1993)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glycerol	Andreishcheva <i>et al.</i> (1999)
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	Glycerol , arabitol	Van Eck <i>et al.</i> (1993)
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Glycerol, arabitol , manitol	(van Zyl & Prior, 1990)
<i>Hortaea werneckii</i>	Glycerol	Petrovic <i>et al.</i> (2002)
<i>Arxula adeninovorans</i>	Glycerol	Yang <i>et al.</i> (2000)

S. cerevisiae, *Z. rouxii* a stejně tak většina v tabulce uvedených organismů využívají glycerol jako hlavní prostředek k udržování stálosti vnitřního prostředí v průběhu osmotického stresu (Brown, 1978, Blomberg & Adler, 1992, Hohmann *et al.*, 2007). Glycerol je jednoduchý vícesytný alkohol nesoucí na každém ze svých tří uhlíků jednu hydroxylovou skupinu. Je vytvářen jako vedlejší produkt při přeměně glukosy či jiných snadno fermentovatelných zdrojů uhlíku na etanol. Přeměna glukosy na etanol je redox-neutrální proces. Následná tvorba biomasy a syntéza oxidovaných meziproduktů (např. acetát) však vytváří nadbytek redukováných ekvivalentů, které jsou při syntéze glycerolu zpětně oxidovány. V případě, že jsou buňky *S. cerevisiae* pěstovány při nedostatku kyslíku, je syntéza glycerolu nezbytně nutná pro udržování vnitrobuněčného redoxního potenciálu a regeneraci NAD⁺ (Yancey, 2005). Buňky glycerol využívají také jako ochranný prostředek proti vysokým teplotám, při vysychání a proti oxidativnímu stresu (Siderius *et al.*, 2000, Pahlman *et al.*, 2001, Yancey, 2005).

Jak je již uvedeno v jedné z předchozích kapitol, odpověď buněk na hyperosmotický stres je řízena signální dráhou HOG (Hohmann & Mager, 2003). V kvasince *S. cerevisiae*, kinasa ScHog1 řídí odpověď na hyperosmotický stres několika různými mechanismy (ovlivnění funkce proteinů; změna exprese genů) jejichž společným výsledkem je zvýšení vnitrobuněčné koncentrace glycerolu. V první řadě je ovlivňována exprese genů, jejichž produkty jsou zodpovědné za přeměnu dihydroxyaceton-P (*ScGPD1/2*) na glycerol-3-P a následně až na samotný glycerol (*ScGPI/2*; Rep *et al.*, 2000). ScHog1 dále ovlivňuje průběh glykolysy tak, aby docházelo ke zvýšené produkci glycerolu. Toho je docíleno regulací aktivity 6-fosfofrukto-2-kinasy, enzymu kódovaného genem *ScPFK26* a zajišťujícího syntézu fruktoso-1,6-bis-P, hlavního aktivátora glykolytické fosfofruktokinasy (Dihazi *et al.*, 2004, Brewster & Gustin, 2014). Společně se zvýšenou syntézou glycerolu dochází také k regulaci jeho transportu přes plasmatickou membránu. V první řadě se uzavírá kanál ScFps1, který je zodpovědný za usnadněnou difusi glycerolu. Druhým transportérem, jemuž je věnována převážná část této dizertační práce, je symportér glycerolu a H⁺ nesoucí název ScStl1. ScStl1 zajišťuje aktivní transport glycerolu z okolního prostředí do buněk a je tedy významným regulátorem vnitrobuněčné koncentrace glycerolu v průběhu hyperosmotického stresu (Ferreira *et al.*, 2005). Výsledkem všech těchto dílčích kroků je vyrovnání turgoru, buněčného objemu, obnovení buněčného cyklu jakožto i ostatních životních projevů buněk kvasinky *S. cerevisiae*.

1.5.1 Metabolismus glycerolu

V předchozích kapitolách již bylo řečeno mnoho o samotném glycerolu a jeho významu pro kvasinkové buňky. Tato kapitola se detailně zaměřuje především na syntézu glycerolu a následně také na transportní proteiny zajišťující jeho přenos přes plasmatickou membránu.

1.5.1.1 Syntéza glycerolu

Glycerol je syntetizován v cytosolu kvasinky *S. cerevisiae* redukcí dihydroxyaceton-P na glycerol-3-P za katalýzy NAD-dependentní glycerol-3-P dehydrogenasy (GPD) a následně defosforylací glycerol-3-P na glycerol. Tato reakce je katalyzována glycerol-3-P fosfatasou (GPP). Dihydroxyaceton-P pro syntézu je poskytován buď glykolysou nebo glukoneogenesí, kdy jsou konzumovány nefermentovatelné zdroje uhlíku. Isoenzymy glycerol-3-P dehydrogenasy byly izolovány a charakterizovány i v několika dalších eukaryotických organismech. Těmi jsou kromě kvasinek například člověk (Hopkinson *et al.*, 1974), *Drosophila melanogaster* (Bewley *et al.*, 1989) a jednobuněčné řasy (Gee *et al.*, 1993). Bylo prokázáno, že v případě mnohobuněčných organismů je úroveň exprese genů kódujících isoenzym *GPD* závislá na druhu a vývoji tkáně, není tedy spojována s odpovědí na stres jako u jednobuněčných organismů. V kvasinkách byla glycerol-3-P dehydrogenasa primárně studována v *S. cerevisiae*, kde je kódována dvěma isogeny, *ScGPD1* a *ScGPD2* (Larsson *et al.*, 1993, Eriksson *et al.*, 1995). Homology těchto genů byly identifikovány také v jiných kvasinkách, mezi něž patří *Sch. pombe* (Ohmiya *et al.*, 1995), *Kluyveromyces thermotolerans* (Neves *et al.*, 2004b), *Pichia angusta* (Neves *et al.*, 2004b), *D. hansenii* (Nilsson & Adler, 1990, Thome, 2004) a v neposlední řadě také *Z. rouxii* (Iwaki *et al.*, 2001).

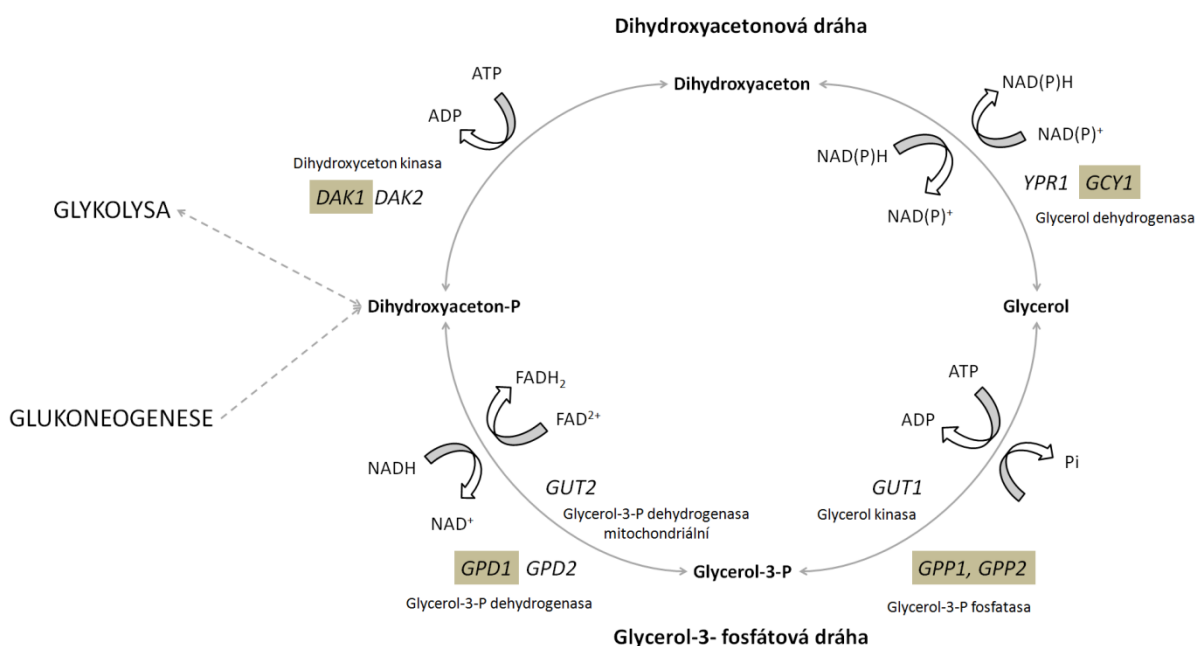
Kvasinka *S. cerevisiae* využívá dva proteiny, *ScGpd1* a *ScGpd2*, z nichž každý se uplatňuje za jiných podmínek. *ScGpd1* je důležitý pro růst buněk a jeho produkce je zvýšena v odpovědi buněk na hyperosmotický stres pomocí dráhy HOG (Blomberg & Adler, 1989, Andre *et al.*, 1991, Albertyn *et al.*, 1994). Exprese genu *ScGPD2* naopak klesá při osmotickém stresu a je výrazně zvýšena při nedostatku kyslíku, což nasvědčuje skutečnosti, že *ScGpd2* je určen k reoxidaci NADH za těchto limitních podmínek (Ansell *et al.*, 1997, Costenoble *et al.*, 2000). V případě kvasinky *Z. rouxii* je situace poněkud odlišná. Hyperosmotický stres nemá na úroveň exprese genů *ZrGPD1* a *ZrGPD2* žádný vliv (van Zyl *et al.*, 1991, Iwaki *et al.*, 2001, Watanabe *et al.*, 2004). To společně s dalšími výsledky vytvořilo hypotézu, že *Z. rouxii* nevyužívá glycerol-3-P dehydrogenasu při syntéze glycerolu

v průběhu vyrovnávání se s hyperosmotickým stresem, jako je tomu u *S. cerevisiae* (Iwaki *et al.*, 2001, Ohshiro & Yagi, 1996).

Také v případě genů kódujících enzym glycerol-3-P fosfatasu byly v *S. cerevisiae* identifikovány dva isogeny (*ScGPP1* a *ScGPP2*; Norbeck *et al.*, 1996). Obě proteinové formy mají velkou afinitu ke glycerol-3-P a jsou vyžadovány pro syntézu glycerolu. Podobně jako v případě *ScGPD*, jsou obě isoformy rozdílně využívány v buněčné odpovědi na osmotický, anaerobní a oxidativní stres (Pahlman *et al.*, 2001). Exprese obou isoform, tedy *ScGPP1* i *ScGPP2*, je indukována hyperosmotickým stresem pomocí dráhy HOG a *ScGPP1* je současně silně ovlivňován aktivitou proteinové kinasy A (Pahlman *et al.*, 2001). Je také známo, že exprese *ScGPP1* je přechodně indukována při anaerobních podmínkách. Delece jednoho z genů nemá žádný významný vliv na osmotoleranci mutantů, zatímco odstranění obou genů *ScGPP* vede k významné citlivosti na hyperosmotický stres, což znamená, že oba proteiny se mohou ve své funkci plně zastupovat (Pahlman *et al.*, 2001, DeLuna *et al.*, 2010).

Přítomnost další dráhy vedoucí v *S. cerevisiae* spíše k degradaci než k syntéze glycerolu byla popsána (Norbeck & Blomberg, 1997) také v některých dalších kvasinkách jako je například *Sch. pombe*, zástupcích rodu *Candida* a *Pichia*, *D. hansenii* a současně také v *Z. rouxii* (Adler *et al.*, 1985, May & Sloan, 1981, Kong *et al.*, 1985, Gancedo *et al.*, 1986, Vasiliadis *et al.*, 1987, van Zyl *et al.*, 1991, Hofmann & Babel, 1980). Glycerol je zde oxidován na dihydroxyaceton a ten je následně přeměněn až na dihydroxyaceton-P vstupující do glykolysy. V případě *S. cerevisiae* je první z reakcí katalyzována glycerol dehydrogenasou (*ScGDC1*, *ScYPR1*), druhá pak enzymem dihydroxyaceton kinasou (*ScDAK1*, *ScDAK2*; Obrázek 7). Přestože je exprese těchto genů stimulována množstvím různých růstových podmínek jako je například hyperosmotický stres (Norbeck & Blomberg, 1997), hlubší význam této dráhy a její zapojení do metabolismu *S. cerevisiae* prozatím nejsou známy.

Z. rouxii je také nositelem dvou genů kódujících glycerol dehydrogenasu, *ZrGDC1* a *ZrGDC2* a dvou genů *ZrDAK* (*ZrDAK1*, *ZrDAK2*; Iwaki *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2002). Jejich exprese je výrazně zvýšena jsou-li buňky *Z. rouxii* pěstovány v podmínkách hyperosmotického stresu, na rozdíl od *ZrGPD1/2* (van Zyl *et al.*, 1991). Nabízí se tedy hypotéza, že geny *ZrGDC* a *ZrDAK* jsou cílem kinasy *ZrHog1* a že tato dráha slouží v buňkách *Z. rouxii* především k syntéze glycerolu v průběhu hyperosmotického stresu.



Obrázek 7: Metabolismus glycerolu v *S. cerevisiae*. Exprese zvýrazněných genů je zvýšena v průběhu hyperosmotického stresu.

1.5.2 Konzumace glycerolu kvasinkami

Množství kvasinkových druhů je schopno za aerobních podmínek využívat glycerol jako zdroj uhlíku (Graca, 2004). Hlavním předpokladem, který musí kvasinky splňovat, aby byly schopné využívat glycerol jako zdroj uhlíku, je přítomnost funkční dráhy pro jeho degradaci. V buňkách *S. cerevisiae* existují dvě výše popsané dráhy, které mohou sloužit nejen k syntéze, ale současně také k degradaci glycerolu (Obrázek 7). Jedná se o tzv. glycerol-3-fosfátovou dráhu a dihydroxyacetonovou dráhu, jejíž průběh je detailněji popsán v předchozí kapitole.

V případě glycerol-3-fosfátové dráhy je v prvním kroku glycerol fosforylován kinasou (*ScGUT1*) na glycerol-3-P a ten následně oxidován na dihydroxyaceton-P vstupující do glykolysy. Druhý z kroků je katalyzován mitochondriální glycerol-3-P dehydrogenasou, kódovanou genem *ScGUT2*. Zkratky genů *GUT* jsou odvozeny z anglického Glycerol Ut^{il}ization. Exprese obou genů *ScGUT* je výrazně reprimována glukosou a naopak podporována přítomností nefermentovatelných zdrojů uhlíku v médiu. I v kvasinkách *D. hansenii*, *Z. rouxii* a *C. utilis* byla prokázána přítomnost této dráhy, ale k detailní charakterizaci genů a jejich produktů došlo pouze v případě *S. cerevisiae* (Adler *et al.*, 1985, van Zyl *et al.*, 1991, Gancedo *et al.*, 1968, Nevoigt & Stahl, 1997). I přestože jsou v případě

kvasinkového druhu *Z. rouxii* nalezeny geny kódující enzymy potřebné pro asimilaci glycerolu, kmen *Z. rouxii* CBS 732^T, který je v této práci detailně zkoumán, není schopen růstu na glycerolu jako jediném zdroji uhlíku. Tato odlišnost pravděpodobně souvisí s výraznou heterogenitou druhu *Z. rouxii*.

1.5.2.1 Transport glycerolu

Takřka před dvaceti lety byl objeven kanál pro glycerol zajišťující jeho transport přes plasmatickou membránu *S. cerevisiae*. Do té doby byl obecně akceptovaný názor, že glycerol může jako malá nenabitá molekula volně procházet přes dvojí vrstvu fosfolipidů prostou difusí (Gancedo *et al.*, 1968). V současné době se má za to, že plasmatická membrána je pro glycerol spíše nepropustná a jeho difuze je zprostředkována kanálem ScFps1 (Oliveira *et al.*, 2003, Tamas *et al.*, 1999, Ahmadpour *et al.*, 2014). Druhým diskutovaným přenašečem zajišťujícím kvasinkám *S. cerevisiae* vstup glycerolu a H⁺ do buněk je ScStl1. ScStl1 nachází uplatnění především tehdy, je-li glycerol využíván jako zdroj uhlíku, dále v průběhu hyperosmotického stresu a v případě, kdy se kultivační teplota liší od optimálních 30 °C (Ferreira & Lucas, 2007, Ferreira *et al.*, 2005, Tulha *et al.*, 2010).

1.5.2.1.1 Kanál Fps1

ScFps1 patří do skupiny aquaglyceroporinů a v *S. cerevisiae* je kódován genem *ScFPS1* (*fdp1* suppressor). Podílí se na transportu glycerolu, As³⁺, Sb³⁺, kyseliny borité a octové (Wysocki *et al.*, 2001, Tamas *et al.*, 1999, Nozawa *et al.*, 2006). Ztráta ScFps1 propůjčuje kvasinkám resistenci k akroleinu, alylalkoholu a znemožňuje využití acetamidu jako zdroje dusíku, což naznačuje, že i tyto sloučeniny mohou být jeho substrátem (Shepherd & Piper, 2010). Kanál ScFps1 funguje podobně jako ostatní aquaglyceroporiny ve formě homotetrameru (Beese-Sims *et al.*, 2011). Na druhou stranu se od aquaporinů liší v konzervovaných motivech a také v délce samotného aminokyselinového řetězce, kdy ScFps1 je cca dvakrát tak dlouhý (669 aminokyselin) v porovnání s ostatními zástupci (méně než 300 aminokyselin) aquaporinové rodiny transportérů (Bill *et al.*, 2001, Hedfalk *et al.*, 2004, Tamas *et al.*, 1999). Aminokyselinový řetězec utváří šest transmembránových α -helixů, dva napůl zabořené α -helixy a dvě koncové domény umístěné v cytosolu (Hedfalk *et al.*, 2004, Tamas *et al.*, 2003, Tamas *et al.*, 1999). N- a C-koncové domény jsou v porovnání s aquaporiny poměrně dlouhé (255 resp. 139 aminokyselin) a slouží především k regulaci funkce samotného kanálu (Tamas *et al.*, 2003, Ahmadpour *et al.*, 2014, Hedfalk *et al.*, 2004). Délka těchto dvou koncových částí se významně liší mezi kanály Fps1 z jiných kvasinkových

druhů, N-konec je však vždy delší než C-konec (Pettersson *et al.*, 2005). Mutace v regulační doméně N-terminální části způsobí nepřetržité otevření kanálu a tak i výstup glycerolu z buňky a tím zvýšenou citlivost k hyperosmotickému stresu, iontům arsenu a kyselině octové (Tamas *et al.*, 2003, Tamas *et al.*, 1999). Také C-terminální část ScFps1 se podílí na regulaci transportu glycerolu (Hedfalk *et al.*, 2004).

Fyziologickou rolí kanálu ScFps1 v homeostasi je především kontrola vnitrobuněčného množství glycerolu. Za normálních podmínek, kdy buňky rostou na glukose jako zdroji uhlíku, je kanál otevřený a buňky tak kontinuálně vypouštějí glycerol, který vzniká jako vedlejší produkt glykolysy (Ahmadpour *et al.*, 2014). V případě, že jsou vystaveny hyperosmotickým podmínkám, dojde k rychlému uzavření kanálu, čímž se zamezí úniku glycerolu a dojde k jeho postupné akumulaci v buňkách. V případě, že buňky exprimují nepřetržitě otevřenou mutantní verzi kanálu, vykazují vysokou citlivost na zvýšenou osmolaritu a současně také nadprodukcí glycerolu, který má za úkol vyrovnat ztráty způsobené jeho činností (Tamas *et al.*, 1999, Tamas *et al.*, 2003). Je-li naopak zabráněno přirozenému úniku glycerolu z buněk delecí genu *ScFPS1*, dochází k jejich přeplnění glycerolem, a to má za následek sníženou schopnost růstu a zhoršené zotavení ze stacionární fáze (Tamas *et al.*, 1999, Beese *et al.*, 2009). ScFps1 je důležitý také pro buněčné spojení v průběhu konjugace dvou haploidních buněk, kdy udržuje jejich osmotickou rovnováhu (Philips & Herskowitz, 1997).

Mnohokrát zmiňovaná kinasa ScHog1 je tzv. negativním regulátorem kanálu ScFps1. Není však přesně známo, zda ScHog1 kontroluje ScFps1 přímo, nebo zda je pouze zprostředkovatelem osmoticky indukovaného uzavření kanálu. V nedávné době byly objeveny i pozitivní regulátory kanálu ScFps1, jsou jimi ScRgc1 a ScRgc2 (Regulator of Glycerol Channel). Jejich delece je spojena s nepřetržitým stresem buněčné stěny, vysokou teplotní citlivostí, zvýšenou akumulací glycerolu a zvýšenou odolností k účinkům zymolyasy, tedy podobné chování jako v případě odstranění genu *ScFPS1* (Beese *et al.*, 2009). Jelikož fyzická interakce mezi ScFps1 a ScRgc1/2 nebyla prokázána, nabízí se hypotéza, že proteiny ScRgc ovlivňují aktivitu kanálu ScFps1 pouze nepřímo. Dále bylo dokázáno, že bazální fosforylace ScRgc2 je závislá na kinase ScHog1, předpokládá se tedy, že ScHog1 snižuje aktivitu ScFps1 právě inhibicí jeho pozitivních regulátorů ScRgc1 a ScRgc2 (Beese *et al.*, 2009).

Kromě *ScFPS1* obsahuje genom *S. cerevisiae* ještě jednoho zástupce genů kódujících aquaglyceroporiny, YFL054c (Pettersson *et al.*, 2005). ScFps1 a Yfl054c (Fps1-like) si nejsou nijak blízce příbuzní a nejeví se být ani paralogy. Yfl054c však obsahuje obdobné konzervované regulační sekvence v N- a C-terminálních doménách, a je přítomen pouze

v kvasinkách blízké příbuzných *S. cerevisiae* (Ahmadpour *et al.*, 2014, Pettersson *et al.*, 2005). I přes značnou snahu o odhalení funkce tohoto proteinu byl jediný fenotyp delece pozorován v přítomnosti vysoké koncentrace etanolu, kdy došlo ke snížení transportu glycerolu (Oliveira *et al.*, 2003, Wysocki *et al.*, 2001). Globální studie exprese různých genů odhalily vyšší množství mRNA *YFL054c* v buňkách vstupujících do stacionární fáze a dále také v průběhu sporulace (Gasch *et al.*, 2000, Ahmadpour *et al.*, 2014). Množství transkriptu se naopak rychle snižuje v průběhu klíčení spór indukovaného glukosou, čímž se nabízí hypotéza, že by tento gen mohl být glukosou reprimován (Ahmadpour *et al.*, 2014). Úloha, kterou sehrává *Yfl054c* ve fyziologii *S. cerevisiae*, však stále zůstává neobjasněná.

Mimo *S. cerevisiae* byl glycerolový kanál typu *ScFps1* charakterizován pouze v *Candida glabrata* a *Z. rouxii* (Beese-Sims *et al.*, 2012, Tang *et al.*, 2005). *C. glabrata* je nositelem dokonce dvou zcela funkčních kanálů, *CgFps1* a *CgFps2*. Prvně jmenovaný hraje důležitější roli v udržování osmotické homeostase a je na rozdíl od *CgFps2* schopen komplementovat fenotyp delece *ScFPS1* v *S. cerevisiae* (Beese-Sims *et al.*, 2012). *CgFps1* a ani *CgFps2* však nezajišťují vstup toxických arsenitých iontů do buněk *C. glabrata*, na rozdíl od *ScFps1* v *S. cerevisiae*. Dalším kvasinkovým druhem, u něhož byl glycerolový kanál charakterizován je *Z. rouxii*. *Z. rouxii* je nositelem jednoho genu *ZrFPS1* a jeho produkt vykazuje podobné strukturální a funkční vlastnosti jako *ScFps1*. Je také schopen plně zastoupit funkci kanálu *ScFps1* v buňkách *S. cerevisiae* *fps1Δ*. Hlavní rozdíl oproti *ScFps1* spočívá v jeho schopnosti přenášet D-arabitol (Tang *et al.*, 2005).

1.5.2.1.2 Symportér glycerolu s H⁺ Stl1

Aktivní transport glycerolu do buněk proti koncentračnímu gradientu byla potvrzena v řadě kvasinek již před více než dvaceti lety (Lages & Lucas, 1995, Lages *et al.*, 1999, van Zyl *et al.*, 1990, Lages & Lucas, 1997, Van Aelst *et al.*, 1991). Rozsáhlá studie se 42 kvasinkovými druhy odhalila, že právě přítomnost velmi aktivního přenosu glycerolu společně s nižší úrovní jeho syntézy *de novo* jsou jedny ze základních vlastností odlišujících osmotolerantní kvasinky od těch méně odolávajících zvýšenému osmotickému tlaku okolí (Lages *et al.*, 1999). Na základě experimentů sledujících vstup radioaktivního glycerolu do buněk byl v případě *P. sorbitophila* zaznamenán konstitutivní symport glycerolu a protonů bez nutnosti hyperosmotického stresu (Lages & Lucas, 1995). Naopak *D. hansenii*, *Z. rouxii* a řada dalších vykazovaly akumulaci glycerolu závislou na přítomnosti NaCl v médiu (Lucas *et al.*, 1990, van Zyl *et al.*, 1990). Z toho bylo vyvozeno, že tyto kvasinky přenášejí glycerol do buněk pouze v případě hyperosmotického stresu a navíc v symportu s Na⁺ (Lages *et al.*, 1999,

Lucas *et al.*, 1990, van Zyl *et al.*, 1990). Osmoticky citlivé druhy, mezi které byla zařazena i *S. cerevisiae*, se odlišovaly také tím, že k akumulaci glycerolu docházelo jen tehdy, kdy byly kvasinky pěstovány na glycerolu jako zdroji uhlíku. To vedlo k závěru, že tyto druhy využívají transportér glycerolu pouze a jedině pro asimilaci glycerolu (Lages *et al.*, 1999).

V následujících letech vznikla řada rozsáhlých a poněkud kontroverzních studií snažících se odhalit a identifikovat gen/protein stojící za aktivním vstupem glycerolu do buněk *S. cerevisiae*. Nejprve bylo publikováno, že za jeho transport v *S. cerevisiae* jsou zodpovědné dva membránové přenašeče ScGup1 a ScGup2 (Holst *et al.*, 2000). Bylo zjištěno, že exprese genu *ScGUP1* je významně zvýšena při růstu buněk na nefermentovatelném zdroji uhlíku, speciálně glycerolu, a že exprese genu *ScGUP2* je zvýšena vysokou koncentrací solí (Holst *et al.*, 2000). Pozdější studie však odhalila, že transkripce genů *ScGUP1* a *ScGUP2* je spíše konstitutivní a tedy nezávislá na okolních podmínkách (Oliveira & Lucas, 2004). Následně byl také potvrzen aktivní vstup glycerolu do mutantních buněk *S. cerevisiae* *gup1Δ gup2Δ gut2Δ* pěstovaných při hyperosmotickém stresu, což naznačilo skutečnost, že nějaký další přenašeč musí být zapojen do aktivního transportu glycerolu (Neves *et al.*, 2004a). Následně bylo zjištěno, že ScGup1 a ScGup2 se nepodílejí na transportu glycerolu, ale jsou to O-acyltransferasy zajišťující přestavění GPI kotvy v plasmatické membráně (Bosson *et al.*, 2006).

ScSTL1 byl poprvé popsán jako gen kódující přenašeč podobný cukerným transportérům (odtud název *STL* - Sugar Transporter Like; Nelissen *et al.*, 1997) a následně bylo zjištěno, že jeho exprese je přechodně indukována hyperosmotickým stresem přes signální dráhu HOG (Rep *et al.*, 2000). Je dokonce jedním z nejvíce indukovaných genů v odpovědi na hyperosmotický stres (Rep *et al.*, 2000, Posas *et al.*, 2000, Yale & Bohnert, 2001, Erasmus *et al.*, 2003, Melamed *et al.*, 2008). Konečné potvrzení, že gen *ScSTL1* kóduje funkční transportní systém pro glycerol v *S. cerevisiae* však přišlo až před deseti lety (Ferreira *et al.*, 2005). Produkt tohoto genu, tedy protein ScStl1, je lokalizován v plasmatické membráně *S. cerevisiae* a přenáší glycerol v symportu s protony. Je členem tzv. Sugar Porter family (SP), která je největší rodinou transportérů v rámci tzv. Major Facilitator Superfamily (MFS). I přes značnou sekvenční odlišnost vykazují jednotliví zástupci rodiny SP (cukerné přenašeče) silnou strukturální konzervovanost (Vardy *et al.*, 2004). Přenašeče patřící do této rodiny jsou monomerní proteiny, obsahující dvě sady šesti hydrofobních transmembránových oblastí propojených smyčkami a současně také pět konzervovaných oblastí rozmístěných po celé délce proteinu.

Přítomnost glukosy reprimuje gen *ScSTL1* a současně také inaktivuje již funkční přenašeče *ScStl1* (Ferreira *et al.*, 2005). V případě, že dojde k úplné konzumaci veškeré glukosy v médiu, fermentativní metabolismus se přepne na respirativní (diauxic shift) a kvasinky *S. cerevisiae* přechodně zvýší expresi genu *ScSTL1*. Exprese je významně zesílena i v případě růstu na nefermentovatelných zdrojích uhlíku (etanol, glycerol, apod.). Avšak ani přítomnost glukosy nezamezí zvýšené syntéze tohoto přenašeče v průběhu hyperosmotického nebo oxidativního stresu či vysoké teploty (Ferreira *et al.*, 2005, Ferreira & Lucas, 2007, Rep *et al.*, 2000, Ferea *et al.*, 1999). Okamžitá produkce přenašeče *ScStl1* za stresových podmínek vypovídá o jeho významu především při náhlých změnách okolního prostředí.

I přestože byla přítomnost aktivního přenosu glycerolu do buněk prokázána v řadě kvasinkových druhů (Lages *et al.*, 1999, Lucas *et al.*, 1990, Lages & Lucas, 1995, Silva-Graca *et al.*, 2003, van Zyl *et al.*, 1990), pouze v případě *S. cerevisiae* a *C. albicans* byly nalezeny odpovídající geny a jejich produkty plně charakterizovány (Ferreira *et al.*, 2005, Kayingo *et al.*, 2009). Patogenní kvasinka *C. albicans* je nositelem dvou homologních genů, nesoucích název *CaSTL1* a *CaSTL2*. Pouze v případě produktu prvně jmenovaného genu bylo prokázáno, že se jedná o symportér glycerolu a protonů do buněk *C. albicans*. Tento přenašeč, na rozdíl od *ScStl1*, není reprimován a inaktivován glukosou (Kayingo *et al.*, 2009). *CaStl2* není glycerolovým přenašečem, ale podle dostupných informací je neznámo jakým způsobem zapojen do metabolismu glycerolu (Kayingo *et al.*, 2009).

Detailní studium genomů dalších kvasinkových kmenů odhalilo, že kvasinka *Sch. pombe* a stejně tak oportunistický patogen *C. glabrata* neobsahují geny podobné *ScSTL1/CaSTL1* a nevykazují také ani aktivní akumulaci glycerolu (Palma *et al.*, 2007, Lages *et al.*, 1999). Snaha o charakterizaci glycerolových přenašečů v jiných, především nekonvenčních kvasinkových kmenech, naráží na absenci účinných nástrojů genového inženýrství. I přes tuto skutečnost vzniklo v nedávné minulosti několik prací snažících se o charakterizaci přenašeče glycerolu v *D. hansenii* a *Pachysolen tannophilus* (González-Hernández, 2010, Pereira *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2013). Hlavním nástrojem byla vždy pouze heterologní exprese v buňkách *S. cerevisiae* postrádající vlastní *ScSTL1*, avšak ani v jednom případě nedošlo k potvrzení, že by vybrané geny kodovaly funkční přenašeče glycerolu.

Jedním z cílů předkládané dizertační práce je charakterizace glycerolových přenašečů v nekonvenční kvasince *Z. rouxii*. Aktivní transport glycerolu do buněk *Z. rouxii* byl poprvé prokázán již před 25 lety (van Zyl *et al.*, 1990), tedy v době, kdy nebyla známá ještě ani sekvence genomu *S. cerevisiae*, natož pak *Z. rouxii*. Jak je již uvedeno na začátku této kapitoly, původní hypotéza zněla, že glycerol je v *Z. rouxii* přenášen v symportu se sodnými

ionty. V průběhu let došlo ke zveřejnění sekvence genomové DNA *Z. rouxii* a k rozvoji technik umožňujících genovou manipulaci tohoto druhu (Sherman *et al.*, 2009, Pribylova *et al.*, 2007b, Pribylova *et al.*, 2007d). Obě tyto skutečnosti byly využity v předkládané dizertační práci k nalezení genů kódujících přenašeče Stl, k jejich podrobné charakterizaci a především také k objasnění, zda skutečně za výjimečnou osmotoleranci *Z. rouxii* stojí přítomnost aktivního transportu glycerolu.

2. Cíle práce

Cílem předkládané dizertační práce bylo přinést více poznatků o fyziologii nekonvenčních kvasinkových druhů (především *Z. rouxii* a *D. hansenii*) s důrazem kladeným na jejich chování v průběhu hyperosmotického stresu a o zapojení glycerolových přenašečů do jejich fyziologie. Dílčí cíle je možno shrnout do několika bodů:

- 1) Podrobná fyziologická analýza kvasinek *Z. rouxii* CBS 732^T, ATCC 42981, *P. sorbitophila* CBS 7064, *D. hansenii* CBS 767 a *S. cerevisiae* FL100.
 - Stanovení velikosti buněk, resistance k toxickým solím a hyperosmotickému stresu, využití různých zdrojů uhlíku, stanovení obsahu kationtů, stanovení obsahu glycerolu, vliv teploty na fyziologii buněk.
- 2) *In silico* analýza genomu kvasinky *Z. rouxii* CBS 732^T a genomů dalších nekonvenčních kvasinek pro nalezení možných transportních systémů pro glycerol (geny homologní k *ScSTL1*). Definování příbuzenských vztahů za současného přihlídnutí k osmotoleranci studovaných druhů.
- 3) Heterologní exprese genů kódujících přenašeče Stl v kvasinkách *Z. rouxii* CBS 732^T a *D. hansenii* CBS 767 v kvasince *S. cerevisiae*.
 - Konstrukce vhodných mutantních kmenů *S. cerevisiae* postrádajících v různých kombinacích geny *STL1*, *FPS1*, *HOG1* a charakterizace jejich fenotypů.
 - Konstrukce plasmidů obsahujících geny *STL* pro expresi v *S. cerevisiae*, integrace genů *STL* do genomu *S. cerevisiae*.
 - Charakterizace aktivity transportérů a fenotypu transformovaných buněk *S. cerevisiae*.
- 4) Podrobná charakteristika genu kódujícího přenašeč Stl v *Z. rouxii* CBS 732^T
 - Konstrukce mutantních kmenů postrádajících gen *ZrSTL* a jejich detailní fyziologická a fenotypová charakterizace.
 - Lokalizace produktu genu *ZrSTL* pomocí značení GFP.
 - Biochemická charakterizace transportérů (kinetické parametry).
 - Charakterizace exprese genů za různých růstových podmínek.

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

V předkládané dizertační práci byly použity chemikálie nejvyšší dostupné čistoty užívané v molekulární biologii od firem Sigma, Penta a Lachner. Původ méně známých chemikálií je uveden v jednotlivých publikacích. Používané enzymy byly vždy od firem Fermentas, New England Biolabs a Roche. Veškeré používané oligonukleotidy byly syntetizovány firmou Sigma. TaqMan eseje pro stanovení úrovně exprese genů *ZrSTL1*, *ZrSTL2*, *ZrFPS1* a *ZrACT1* syntetizovala firma Geneti Biotech.

3.1.1 Kmeny kvasinek a bakterií

- Divoké kvasinkové kmeny použité v rámci této práce:

Z. rouxii CBS 732^T, ATCC 42981

S. cerevisiae FL100 (ATCC 28383)

D. hansenii CBS 767

P. farinosa CBS 7064

- Mutantní kvasinkové kmeny použité v rámci této práce:

Z. rouxii UL4 (*ura3*; Pribylova & Sychrova, 2003)

DLA2 (*ura3 leu2Δ::loxP ade2Δ::loxP*; Pribylova *et al.*, 2007a)

S. cerevisiae BW31a (MATa *ade 2-1 can1-100 his3-11/15 leu2-3/112 mal10 trp1-1 ura3-1 nhalΔ::LEU2 ena1::HIS3::ena4Δ*;

Kinclova-Zimmermannova *et al.*, 2005)

W303-1A (MATa *ade2-1 can1-100 his3-11/15 leu2-3/112 mal10 trp1-1 ura3-1*; Wallis *et al.*, 1989)

W303-1A *fps1Δ* (W303-1A *fps1Δ::LEU2*; Van Aelst *et al.*, 1991)

BY4741 (MATa *his3-1 leu2-0 met15-0 ura3-0*; EUROSCARF collection)

YSH 818 (W303-1A *hog1Δ::leu2*; Eberhardt & Hohmann, 1995)

AQ (*ura3*; A. Querol, Valencia, Spain)

EBY VW.4000 (CEN.PK2-1C *hxt17Δ hxt13Δ hxt15Δ hxt16Δ hxt14Δ*

hxt12Δ hxt9Δ hxt11Δ hxt10Δ hxt8Δ hxt514Δ hxt2Δ hxt367Δ gal2Δ

stl1Δ agt1Δ ydl247wΔ yjr160cΔ; Wieczorke *et al.*, 1999)

CEN.PK-1C (MATa *ura3-52 his3-Δ1 leu2-3,112 trp1-289, MAL2-8c SUC2*;
EUROSCARF collection)
S288C (MATa *SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6*;
Mortimer & Johnston, 1986)

Sbírký kmenů:

CBS collection – The Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity
Centre, Utrecht, Nizozemí

ATCC collection - American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

EUROSCARF collection - Institute for Molecular Biosciences, Johann Wolfgang Goethe-
University Frankfurt, Frankfurt, Německo

- Mutantní kvasinkové kmeny konstruované v rámci této práce:

Bližší informace o konstrukci kmenů jsou uvedeny v jednotlivých publikacích.

Z. rouxii MS1 (UL4 *stl1Δ::loxP*)

MS2 (UL4 *stl2Δ::loxP*)

MS12 (UL4 *stl2Δ::loxP stl1Δ::kanMX*)

DLAM1 (DLA2 *stl1Δ::loxP*)

DLAM2 (DLA2 *stl2Δ::loxP*)

DLAM12 (DLA2 *stl1Δ::loxP stl2Δ::kanMX*)

S. cerevisiae BY4741 *stl1Δ* (*stl1Δ::loxP*)

hog1Δ (*hog1Δ::loxP*)

fps1Δ (*fps1Δ::loxP*)

hog1Δ stl1Δ (*hog1Δ::loxP stl1Δ::kanMX*)

stl1Δ fps1Δ (*stl1Δ::loxP fps1Δ::loxP*)

hog1Δ stl1Δ fps1Δ (*hog1Δ::loxP stl1Δ::loxP fps1Δ::loxP*)

W303 *hog1Δ stl1Δ* (YSH818 *stl1Δ::kanMX*)

fps1Δ stl1Δ (W303-1A *fps1Δ::LEU2 stl1Δ::kanMX*)

fps1Δ stl1Δ::ZrSTL1 (W303-1A *fps1Δ::LEU2 stl1Δ::ZrSTL1-TPS1^T-
kanMX*)

fps1Δ stl1Δ::ZrSTL2 (W303-1A *fps1Δ::LEU2 stl1Δ::ZrSTL2-TPS1^T-
kanMX*)

fps1Δ stl1Δ::ScSTL1 (W303-1A *fps1Δ::LEU2 stl1Δ::ScSTL1-TPS1^T-*

kanMX)
fps1Δ stl1Δ::DhSTL2 (W303-1A *fps1Δ::LEU2 stl1Δ::DhSTL2-TPS1^T*-
kanMX)

- Bakteriální kmen:

E. coli XL1-Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F [proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(*ter^r*)*]; Stratagene)

3.1.2 Kultivační půdy

Pro přípravu médií byly používány komerčně připravené směsi od firem Difco, Sigma a Formedium. Kultivace standardně probíhala v médiích YPD (1% yeast extract, 2% bacto peptone, 2% glukosa), YEPG (1% yeast extract, 2% bacto peptone, 1% etanol, 1% glycerol), YP (1% yeast extract, 2% bacto peptone, 2% zdroj uhlíku uveden v textu), YNB-NH₄ (0,69% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glukosa (pokud není uvedeno jinak)) a YNB-pH (0,17% yeast nitrogen base without ammonium sulfate and amino acids, without folic acid, without riboflavin, 0,4% síran amonný, 2% glukosa, fruktosa či manitol (upřesněno v textu)). Kultivace *E. coli* probíhala ve standardním médiu Luria-Bertani (LB médium). Pevné půdy byly připravovány přidáním 2 % agaru. Přefiltrované auxotrofní přídavky byly do média přidávány v množství udávaném výrobcem vždy po autoklávování (BSM complete, BSM-ura; Formedium). Selektivní půdy pro *E. coli* byly připravovány s přídavkem ampicilinu v konečné koncentraci 100 µg/ml do média po autoklávování. Selektivní média pro kultivaci kvasinek s přídavkem Geneticinu byla připravována přidáním této látky o konečné koncentraci 900 µg/ml pro *S. cerevisiae* a 100 µg/ml pro *Z. rouxii*, taktéž po autoklávování.

3.1.3 Plasmidy

- Plasmidy použité v této práci:

Plasmidy pro *S. cerevisiae*

YEp352 – *ScURA3*, 2µ, *Amp^R*, *ori* (Hill *et al.*, 1986)

pGRU1 - *ScURA3*, *GFP*, 2µ, *Amp^R*, *ori* (NCBI, Accession no. AJ249649)

pNHA1-985 - *ScURA3*, *NHA1^P-NHA1*, 2µ, *Amp^R*, *ori* (Kinclova *et al.*, 2001)

pNHA1-985GFP - *ScURA3*, *NHA1^P-NHA1-GFP*, 2µ, *Amp^R*, *ori* (Kinclova *et al.*, 2001)

pUG6 – *loxP-TEF2^P-kanMX-TEF2^T-loxP*, *Amp^R*, *ori* (Guldener *et al.*, 1996)

pSH47 - *ScURA3*, *GAL1^P-CRE-CYC1^T*, *CEN6/ARSH4*, *Amp^R*, *ori* (Guldener *et al.*, 1996)

pHI-U – *ADHI^P-pHluorin*, *ScURA3*, *2μ*, *Amp^R*, *ori* (Maresova *et al.*, 2010)

pVT100-U - *ScURA3*, *2μ*, *Amp^R*, *ori* (Vernet *et al.*, 1987)

Plasmidy pro *Z. rouxii*

pZEU - *ScURA3*, *pSR1*, *Amp^R*, *ori* (Pribylova *et al.*, 2007a)

pZCA - *ScURA3*, *ZrCEN A*, *Amp^R*, *ori* (Pribylova *et al.*, 2007b)

pZGFP - *ScURA3*, *GFP*, *pSR1*, *Amp^R*, *ori* (Pribylova *et al.*, 2007a)

pZCRE - *ScGAL1^P-CRE*, *ScURA3*, *pSR1*, *Amp^R*, *ori* (Pribylova *et al.*, 2007a)

pZpH - *ADHI^P-pHluorin*, *ScURA3*, *pSR1*, *Amp^R*, *ori* (Stribny *et al.*, 2012)

- Plasmidy konstruované v rámci této práce:

Bližší informace o konstrukci jsou uvedeny v jednotlivých publikacích.

Plasmidy pro *S. cerevisiae*

- Plasmidy pro zvýšenou expresi genů:

YEp352-ZrSTL1-ScURA3, *NHA1^P-ZrSTL1*, *2μ*, *Amp^R*, *ori*

YEp352-ZrSTL2 - *ScURA3*, *NHA1^P-ZrSTL2*, *2μ*, *Amp^R*, *ori*

YEp352-ScSTL1 - *ScURA3*, *NHA1^P-ScSTL1*, *2μ*, *Amp^R*, *ori*

YEp352-DhSTL2 - *ScURA3*, *NHA1^P-DhSTL2*, *2μ*, *Amp^R*, *ori*

- Plasmidy pro lokalizaci proteinů v buňce:

pGRU1-ZrSTL1 - *ScURA3*, *NHA1^P-ZrSTL1-GFP*, *2μ*, *Amp^R*, *ori*

pGRU1-ZrSTL2 - *ScURA3*, *NHA1^P-ZrSTL2-GFP*, *2μ*, *Amp^R*, *ori*

pGRU1-ScSTL1 - *ScURA3*, *NHA1^P-ScSTL1-GFP*, *2μ*, *Amp^R*, *ori*

pGRU1-DhSTL2 - *ScURA3*, *NHA1^P-DhSTL2-GFP*, *2μ*, *Amp^R*, *ori*

- Plasmidy pro pomnožení integrační kazety sloužící k integraci genů *STL* do genomu *S. cerevisiae*:

YEp352-ZrSTL1-TPS1t-kanMX - *NHA1^P-ZrSTL1-TPS1^T*, *loxP-TEF2^P-kanMX-TEF2^T-loxP*, *2μ*, *Amp^R*, *ori*

YEp352-ZrSTL2-TPS1t-kanMX - *NHA1^P-ZrSTL2-TPS1^T*, *loxP-TEF2^P-kanMX-TEF2^T-loxP*, *2μ*, *Amp^R*, *ori*

YEp352-ScSTL1-TPS1t-kanMX - *NHA1^P-ScSTL1-TPS1^T*, *loxP-TEF2^P-kanMX-TEF2^T-loxP*, *2μ*, *Amp^R*, *ori*

YEp352-DhSTL2-TPS1t-kanMX - *NHA1^P-DhSTL2-TPS1^T*, *loxP-TEF2^P-kanMX-*

TEF2^T-loxP, 2μ, Amp^R, ori

Plasmidy pro *Z. rouxii*

Každý z uvedených plasmidů pro *Z. rouxii* byl vyroben se dvěma různě dlouhými promotory (250 nt a 2000 nt).

- Plasmidy pro zvýšenou expresi genů:

pZEU-ZrSTL1 - *ScURA3, ZrSTL1^P-ZrSTL1, pSR1, Amp^R, ori*

pZEU-ZrSTL2 - *ScURA3, ZrSTL2^P-ZrSTL2, pSR1, Amp^R, ori*

- Centromerové plasmidy:

pZCA-ZrSTL1 - *ScURA3, ZrSTL1^P-ZrSTL1, ZrCEN A, Amp^R, ori*

pZCA-ZrSTL2 - *ScURA3, ZrSTL2^P-ZrSTL2, ZrCEN A, Amp^R, ori*

- Plasmidy pro lokalizaci proteinů v buňce:

pZGFP-ZrSTL1 - *ScURA3, ZrSTL1^P-ZrSTL1-GFP, pSR1, Amp^R, ori*

pZGFP-ZrSTL2 - *ScURA3, ZrSTL2^P-ZrSTL2-GFP, pSR1, Amp^R, ori*

3.2 Metody

3.2.1 Mikrobiologické metody

Kultivace a uchovávání kultur

Sledování růstu buněk v médiu – tekutá média (růstové křivky), pevná média (kapkové testy)

Mikroskopie kvasinek

Stanovení počtu buněk a sušiny biomasy odpovídající 1 ml suspenze o $A_{600} = 1$

Stanovení přežívání hyperosmotického a hyposmotického stresu

Stanovení velikosti buněk

Stanovení přežívání desikace buněk

3.2.2 Molekulárně-biologické metody

Manipulace s DNA – purifikace a precipitace DNA, restriční štěpení, stanovení koncentrace

Konstrukce plasmidů homologní rekombinací

Polymerasová řetězcová reakce (PCR) – s izolovanou plasmidovou a genomovou DNA a nebo s celými buňkami (Colony PCR)

qRT – PCR

Izolace DNA z kvasinek (plasmidová, genomová) a *E. coli* (plasmidová)

Izolace RNA z buněk *Z. rouxii*

Transformace *S. cerevisiae*, *Z. rouxii*, *E. coli* a selekce transformantů

Delece genů v *S. cerevisiae* a *Z. rouxii*

3.2.3 Biochemické metody

Stanovení obsahu K^+ v buňkách kvasinek – Atomová absorpční spektrofotometrie

Enzymatické stanovení obsahu glycerolu v *S. cerevisiae*, *Z. rouxii*, *P. sorbitophila*, *D. hansenii*

Stanovení vnitrobuněčného pH v *S. cerevisiae* a *Z. rouxii*

Stanovení akumulace ^{14}C -glycerolu buňkami *S. cerevisiae* a *Z. rouxii*

Stanovení K_m a V_{max} transportu ^{14}C -glycerolu v buňkách *S. cerevisiae* a *Z. rouxii*

Monitorování symportu glycerolu a protonů v *Z. rouxii*

Monitorování aktivity Pma1 v buňkách *S. cerevisiae* a *Z. rouxii* *in vivo*

3.2.4 Biofyzikální metody

Elektroforetická analýza DNA

Stanovení membránového potenciálu

3.2.5 Bioinformatické metody

Vzájemné porovnávání sekvencí genů a proteinů

Analýza promotorových oblastí genů

Tvorba fylogenetických stromů

Predikce transmembránových oblastí proteinů

Vyhledávání konzervovaných oblastí genů

Navrhování primerů

4. Výsledky

Výsledky této dizertační práce jsou shrnuty celkem ve třech publikovaných článcích (kapitola 4.1, 4.2, 4.3), jednom rukopise (kapitola 4.4) a v jedné další kapitole, obsahující nepublikovaná data týkající se především kvasinky *D. hansenii* CBS 767.

Všechny tři publikované práce a současně také připravovaný rukopis na sebe volně navazují a dohromady tak vytvářejí ucelený soubor nových poznatků týkajících se především metabolismu nekonvenčních osmotolerantních kvasinek, zapojení glycerolových přenašečů do jejich metabolismu a následně i využití těchto přenašečů v průmyslových kmenech *S. cerevisiae*.

Publikace č. 1: **Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses.** Tato publikace popisuje fyziologické rozdíly mezi čtyřmi nekonvenčními osmotolerantními kvasinkovými druhy (*D. hansenii*, *P. sorbotophila* a dva kmeny *Z. rouxii*) a jedním kmenem *S. cerevisiae*.

Publikace č. 2: **The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions.** V rámci této práce je popsána konstrukce mutantních kmenů odvozených od *S. cerevisiae* BY4741 postrádajících geny *ScFPS1*, *ScSTL1* a *ScHOG1* v různých kombinacích. Vzniklé mutantní kmeny byly detailně charakterizovány za účelem nalezení dosud nepublikovaných úloh glycerolových přenašečů (*ScFps1*, *ScStl1*) a jejich hlavního regulátoru, kinasy *ScHog1*.

Publikace č. 3: **Two glycerol uptake systems contribute to the high osmotolerance of *Zygosaccharomyces rouxii*.** Hlavním výsledkem této rozsáhlé práce je charakterizace glycerolových přenašečů v osmotolerantní kvasince *Z. rouxii*. Publikace popisuje unikátní role těchto přenašečů a jejich příspěvek k výjimečným vlastnostem *Z. rouxii*.

Rukopis č. 1: **The glycerol transporter from *Zygosaccharomyces rouxii* improves the fitness of *Saccharomyces cerevisiae* assimilating mannitol.** Poslední z předkládaných prací shrnuje poznatky získané o glycerolových přenašečích v *S. cerevisiae* a *Z. rouxii* a využívá je v heterologní expresi genu *ZrSTL1* v *S. cerevisiae*. Cílem této práce je poukázat na to, jakým způsobem mohou být vylepšeny průmyslově používané kmeny *S. cerevisiae* například při přeměně manitolu na bioetanol apod.

4.1 Publikace č. 1 - Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses.

V přírodě se vyskytuje velké množství kvasinkových druhů, přirozeně obývajících různá, mnohdy značně nehostinná prostředí. Kvasinky se tak musí vyrovnávat s vysokými koncentracemi solí a cukrů, s vysokým stupněm ozáření, nedostatkem živin, extrémními teplotami, vysycháním apod. Pravděpodobně ještě více stresující jsou pro buňky náhlé změny těchto podmínek, kterým jsou vystavovány. V průběhu evoluce došlo k vývoji druhů, které jsou extrémně odolné vůči výše zmíněným podmínkám a jejich náhlým změnám. Řadíme je mezi tzv. nekonvenční kvasinkové druhy a odhalení podstaty jejich výjimečných vlastností se v současné době dostává do popředí kvasinkového výzkumu.

Úkolem této práce bylo porovnání čtyř kmenů tří nekonvenčních kvasinkových druhů (*Zygosaccharomyces rouxii* CBS 732^T a ATCC 42981, *Debaryomyces hansenii* CBS 767, *Pichia sorbitophila* CBS 7064 – v publikaci uváděna také jako *Pichia farinosa* CBS 7064) s jedním divokým kmenem *Saccharomyces cerevisiae* (FL100). Studované parametry zahrnují nejen základní fyziologické vlastnosti za nestresových podmínek, jako například velikost buněk, celkovou produkci glycerolu, membránový potenciál $\Delta\Psi$, vnitrobuněčnou koncentraci K^+ či využití různých zdrojů uhlíku, ale také chování buněk po vystavení nejrozličnějším druhům stresu. Mezi testované stresové podmínky patří vliv vysokých koncentrací solí a cukrů na buněčný růst, vliv kultivační teploty v kombinaci s mírným hyperosmotickým stresem, odolnost k toxickým kationtům (Na^+ , Li^+ , organické kationty), dehydratace, růst v limitovaném množství K^+ atd.

Výsledky této práce ukazují, že i přestože se buňky nijak významně neliší v základních fyziologických parametrech (velikost buněk, celková produkce glycerolu, vnitrobuněčný obsah K^+), vykazují výrazné rozdíly v přežití dehydratace, v relativním membránovém potenciálu, v růstu v přítomnosti toxických kationtů a velice rozdílně se i vypořádávají s limitovaným množstvím draslíku. Dále bylo zjištěno, že například druhy izolované z cukerných prostředí (*P. sorbitophila*) vykazují vysokou odolnost i vůči solím a naopak (*Z. rouxii* ATCC 42981). Žádný z testovaných druhů však nevykazoval osmofilní chování. Obecně lze říci, že nejvíce odolným druhem této studie je *P. sorbitophila*, na druhou stranu *Z. rouxii* CBS 732^T se ve světle ostatních testovaných kvasinek řadí mezi ty nejméně odolné, mnohdy až citlivé.

Tato charakteristika základních fyziologických parametrů jedněch z nejvíce studovaných nekonvenčních kvasinkových druhů současnosti by mohla sloužit jako základ pro hlubší analýzu a současně také napomoci řadě biotechnologických procesů s využitím kvasinek.

Bubnová, M., J. Zemančíková & H. Sychrová, (2014) Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses. *Yeast* **31**: 309-321.

Research Article

Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses

Michala Bubnová^{1,2}, Jana Zemančíková¹ and Hana Sychrová^{1*}

¹Department of Membrane Transport, Institute of Physiology Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague 4, Czech Republic

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

*Correspondence to:

H. Sychrová, Department of
Membrane Transport, Institute of
Physiology AS CR, Videnska 1083,
14220 Prague 4, Czech Republic.
E-mail: sychrova@biomed.cas.cz

Abstract

Osmotolerance is the ability to grow in an environment with a high osmotic pressure. In this study we compared the physiological parameters and tolerance to osmotic and non-osmotic stresses of three osmotolerant yeast species, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia farinosa* (*sorbitophila*) and *Zygosaccharomyces rouxii*, with those of wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. Although the osmotolerant species did not differ significantly in their basic parameters, such as cell size or growth capacity, they had different abilities to survive anhydrobiosis, potassium limitation or the presence of toxic cationic drugs. When their osmotolerance was compared, the results revealed that some of the species isolated as sugar/polyol-tolerant (e.g. *P. farinosa*) are also highly tolerant to salts and, vice versa, some strains isolated from an environment with high concentration of salt (e.g. *Z. rouxii* ATCC 42981) tolerate high concentrations of sugars. None of the tested strains and species was osmophilic. Taken together, our results showed that *P. farinosa* (*sorbitophila*) is the most robust species when coping with various stresses, while *Z. rouxii* CBS 732, although osmotolerant in general, is not specifically salt-tolerant and is quite sensitive to most of the tested stress conditions. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Received: 29 January 2014
Accepted: 9 June 2014

Keywords: yeast osmotolerance; salt stress; oxidative stress; desiccation survival; non-conventional yeasts

Introduction

Yeasts are essential microorganisms, not only for the production of many kinds of food and beverages, but their role in various new biotechnological processes, e.g. vitamin or biofuel production, has been steadily increasing over the last few decades. More and more attention is being focused on the exploitation and use of so-called non-conventional yeast species. Among them, the osmotolerant yeasts are distinguished by their ability to survive a high osmotic pressure in the environment. This ability may be advantageous and economical in the biotechnological production of various compounds. Some osmotolerant yeast species are known to survive an extremely high concentration of sugars, whereas others tolerate high concentrations of salts. It is evident that the adaptation to

an environment with a low water activity (a_w), i.e. high osmotic pressure, may differ from species to species but is generally based on a combination of several common mechanisms, such as changes in plasma membrane composition, in redox metabolism, in the production and transport of glycerol and in the activity of various ion transporters (Hohmann, 2002; Thome, 2007). Apparently, all yeast species use glycerol as the osmolyte to compensate for the increased external osmotic pressure, but synthesized glycerol is partly lost by diffusion across the plasma membrane. One of the crucial common features of the high sugar- and salt-tolerant yeast species is their ability to efficiently transport glycerol into the cells. In an extensive study of the common mechanisms of halotolerance in yeast, several tens of yeast species were examined and it was shown that *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces hansenii*

and *Pichia sorbitophila* (*P. farinosa*) are among the most osmotolerant yeasts due to their ability to actively retransport lost glycerol (in symport with protons or sodium cations) back into the cells (Lages *et al.*, 1999). This remarkable ability to accumulate glycerol produced by cells in response to osmotic pressure, but lost by simple diffusion, distinguishes osmotolerant species from osmosensitive ones and it contributes to their economical behaviour – less glycerol produced to compensate for the osmotic pressure (Hohmann, 2002; Lages *et al.*, 1999).

We were interested in whether the osmotolerant yeasts that are able to accumulate glycerol via specific uptake systems also share other properties that distinguish their physiology from conventional osmosensitive yeast species. We chose four strains of the three most-studied osmotolerant yeast species with sequenced genomes, which differ in their original niche and in the level of their osmotolerance (Sherman *et al.*, 2009). Although all these strains/species have been characterized quite intensively, there are only a few studies that have compared their osmotolerant properties directly. Our objective was to compare the basic physiological parameters and phenotypes of the selected osmotolerant strains/species under various stresses with those of a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*.

Zygosaccharomyces rouxii is an osmotolerant yeast species that is a close relative of *S. cerevisiae* but it is capable of growing in a very low water-activity environment, especially when caused by high sugar concentrations (up to 60% w/v glucose). As a result, it is the most notorious yeast, causing serious spoilage losses in the food industry (Fleet, 1992; Jermini and Schmidt-Lorenz, 1987; Martorell *et al.*, 2007). On the other hand, *Z. rouxii* plays an irreplaceable role in the traditional fermentation needed for the production of balsamic vinegar, miso or soya sauce (Onishi, 1963; Solieri and Giudici, 2008). Another remarkable feature of this species is its fructophilily, i.e. *Z. rouxii* prefers fructose to glucose as the source of carbon (Leandro *et al.*, 2009). In this study, we used two strains, CBS 732 (ATCC 2623), which was isolated from concentrated black grape must (Kurtzman, 1990), and ATCC 42981, which originates from the Japanese traditional salty seasoning miso (Kiuchi *et al.*, 1978). These two strains differ in many properties (Pribylova *et al.*, 2007a, 2007b) and,

in fact, ATCC 42981 is a robust *Z. rouxii*–*Z. pseudorouxii* interspecies hybrid that was formed so recently that its genome has not had time to decay, and thus the strain profits from a larger genome (Gordon and Wolfe, 2008).

Debaryomyces (formerly *Torulospora*) *hansenii* is a cryotolerant marine yeast that can tolerate 20% salinity in its environment and which, according to physiological studies, was classified as a halophilic yeast (Prista *et al.*, 1997). Although it is a non-pathogenic yeast, its genome sequence clusters with the group of pathogenic *Candida* species (Sherman *et al.*, 2009). This yeast is thought to be halophilic, mainly when grown at a supraoptimal temperature (Papoušková and Sychrová, 2007; Prista *et al.*, 1997). *D. hansenii* strains were isolated from various environments with high salt concentrations, such as marine water or traditional cheeses and sausages (Prista *et al.*, 2005). A recent study (Michan *et al.*, 2013) revealed that five strains belonging to the halotolerant closely related *Debaryomyces hansenii/fabryi* species (but isolated from various environments) are highly different with regard to their tolerance of salt and oxidative stresses. The strain used in this study (CBS 767) originates from Carlsberg laboratories and can tolerate NaCl concentrations of up to 25% (Breuer and Harms, 2006; Butinar *et al.*, 2005).

Pichia (*Milleriozyma*) *farinosa* (CBS 7064) was originally isolated from 70% sorbitol solution and described as a new species named *Pichia sorbitophila* (de Miranda *et al.*, 1980; Kurtzman *et al.*, 2010). Although *P. farinosa* is extremely osmotolerant and despite high sugar or polyol concentrations is capable of growing in a saturated solution of KCl (Rosa and Gabor, 2006), it is neither halophilic nor osmophilic. Its optimal growth was observed in the absence of extra osmotic pressure (Maresova and Sychrová, 2003). Whereas *Z. rouxii* and *D. hansenii* were shown to actively transport glycerol in symport with sodium cations, *P. sorbitophila* (*farinosa*) was found to use an inward gradient of protons as a source of energy to accumulate glycerol (Lages and Lucas, 1994, 1995; Lages *et al.*, 1999). In this study, we show that although all tested strains are relatively osmotolerant, they differ substantially in many other parameters, e.g. in their relative membrane potential, their tolerance to toxic cations and drugs or their ability to survive desiccation.

Materials and methods

Yeast strains

The yeast strains used in this study were *Zygosaccharomyces rouxii* CBS 732 (ATCC 2623), *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 42981, *Debaryomyces hansenii* CBS 767 (ATCC 36239), *Pichia farinosa* CBS 7064 (formerly *Pichia sorbitophila*) and *Saccharomyces cerevisiae* FL100 (ATCC 28383).

Media and growth conditions

Yeast strains were routinely grown in the following media: YPD (1% yeast extract, 2% bactopectone and 2% glucose; 2% agar for solid media); YNB-NH₄ (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose; 2% agar for solid media); and K⁺-free YNB-F (0.175% YNB-F without amino acids, ammonium sulphate and potassium (Formedium™ UK), adjusted to pH 5.8 and supplemented with 0.4% ammonium sulphate, 2% glucose, various concentrations of KCl and 2% agar for solid media). For the non-fermentable carbon source assimilation tests, the glucose in YPD and in YNB was replaced with 3% glycerol, 3% ethanol or 1.5% glycerol, in combination with 1.5% ethanol. Apart from the temperature-tolerance test, the cells were grown at 30°C.

Drop tests

Cells grown on YPD plates at 30°C for 48 h were suspended in sterile water to $A_{600} = 2$. Serial 10-fold dilutions of cell suspensions were spotted on YPD or YNB plates without, or supplemented with, NaCl (0.3–2 M), KCl (0.3–2 M), LiCl (10 mM–1 M), sorbitol (10–30%), glucose (15–45%), cationic drugs (hygromycin B, 10–100 µg/ml; TMA, 0.3–0.8 M; spermine, 1.5–3 mM) or H₂O₂ (2–20 mM), as appropriate. For estimation of the minimal potassium requirements, drop tests were performed with YNB-F plates without the addition of KCl (15 µM residual K⁺ concentration in the medium) or with KCl added (10 µM–500 mM). Growth was monitored for 7 days.

Growth curves

The growth of liquid cultures was monitored in microplates with an ELx808 Absorbance Microplate

Reader. Microplate wells were filled with 100 µl of the required medium and inoculated with the cell suspension to final $A_{600} = 0.002$. Microplates were intensively shaken at 30°C. The absorbance in each well was monitored at $\lambda = 595$ nm for 48 h. The acquired data were processed as described previously (Maresova and Sychrova, 2007).

CFU, biomass weight and cell size

Cell suspensions ($A_{600} = 2$) were used to estimate the number of colony-forming units (cfu) and the dry weight of cells; 10 µl aliquots were 10⁴-fold diluted, and then 100 µl of the diluted suspension was spread three times on YPD plates. Colonies were counted 3 days later and the number of cells in 1 ml of the original culture was calculated. For the estimation of dry weight, 1 ml of cell suspension was washed twice with water and resuspended in 1 ml water. Cell suspensions (three in parallel for each strain and species) were exposed to 90°C for 12 h. The dried cells were weighed and the dry weight of cells in 1 ml culture calculated.

To determine the cell size, a CasyCell Counter (Roche) with a 60 µm capillary was used; 10 µl cells in the exponential phase of growth in YNB and in YPD were diluted in 10 ml CasyTon® dilution buffer and subsequently analysed according to the manufacturer's instructions. The experiment was repeated at least twice, and each time 2×10^4 cells were analysed. Intervals containing the most typical 60% of the population are shown in the box plot diagram with the mean diameter (Figure 1).

Survival of abiotic stress

Cells grown to stationary phase at 30°C in 100 ml YPD were dehydrated and subsequently rehydrated to estimate their anhydrobiosis tolerance (Borovikova *et al.*, 2014). Harvested cells were washed and dehydrated by convective drying at 30°C for 15–16 h. The dehydrated biomass was rehydrated in distilled water at room temperature for 10 min. Cell survival was estimated after appropriate dilution of the rehydrated biomass, plating on solid YPD and counting the colonies (cfu) after 2 days of growth at 30°C. The experiments were repeated three times; all strains were processed in three parallels in each experiment.

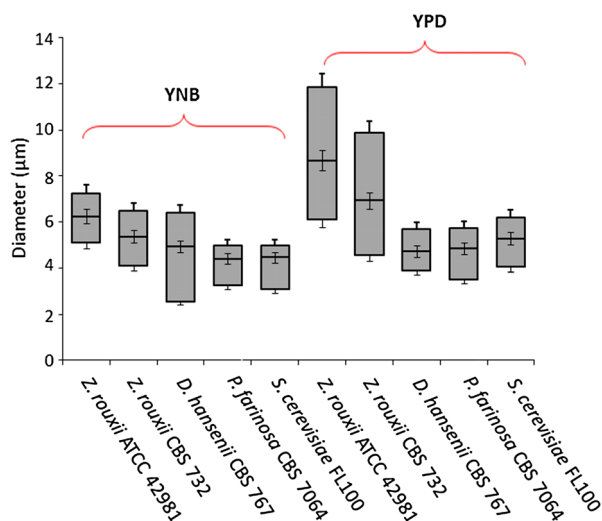


Figure 1. Cell diameter: the size of exponentially growing cells in YPD and YNB was estimated and the intervals containing the most typical 60% of the cell population are shown as a grey box; the mean diameter is represented by a line inside the box; average results \pm SD are shown

Relative plasma-membrane potential

The differences in relative membrane potential among the species were estimated by an assay based on the potential-dependent redistribution of a fluorescent dye (diS-C3(3), Molecular Probes) in cells (Denksteinova *et al.*, 1997). Yeast cells were grown in 20 ml liquid YPD medium to $A_{600}=0.8-1$, harvested, washed twice with 10 mM MES buffer (pH 6, adjusted with triethanolamin) and resuspended in the same buffer to $A_{600}=0.1$. The fluorescent probe (from a 0.1 mM stock solution in ethanol) was added to 3 ml cell suspension to a final concentration of 0.2 μ M. The fluorescence emission spectra at 560 and 580 nm were measured on an ISS PC1 spectrofluorometer (excitation 531 nm). The staining curves (the dependence of the emission intensity ratio, $I_{580}:I_{560}$, on the duration of staining, t) were fitted as described (Malac *et al.*, 2005) and the value of the intensity ratio at equilibrium was estimated (Maresova *et al.*, 2009). Average results \pm SD of three independent experiments are shown. As a control for the dependence of probe influx on the plasma-membrane potential, we added a protonophore [carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone (CCCP), 10 μ M final concentration] that depolarized the membrane and the efflux of the probe was observed (sudden shift in λ_{max} , not shown). The estimated levels of

relative membrane potential of all tested strains were sensitive to the addition of CCCP (not shown).

Intracellular K⁺ content

Yeast cells were grown in 20 ml liquid YPD medium to $A_{600}=0.8-1$, harvested, quickly washed in ice-cold deionized water and resuspended in 20 ml incubation buffer [10 mM Tris, 0.1 mM $MgCl_2$, 10 mM RbCl, pH adjusted to 4.4 with citric acid and then increased to 4.5 with $Ca(OH)_2$]; 5 ml aliquots of cell suspension were withdrawn, filtered through Millipore membrane filters, washed with 5 ml 20 mM $MgCl_2$ and then extracted in 5 ml extraction solution (0.2 M HCl and 10 mM $MgCl_2$). The extracted amount of K⁺ was estimated by atomic absorption spectroscopy (Kinclova *et al.*, 2001). Samples were taken in triplicate and the average results of three independent experiments \pm SD are presented.

Total glycerol production

To analyse the total production of glycerol, cells were grown in 20 ml YPD medium to $A_{600}=1$. Two aliquots of 1 ml were then withdrawn, boiled for 10 min, mixed intensively with a vortex and centrifuged (14 000 $\times g$ for 10 min). The glycerol concentration was measured in the supernatant using an EBO glycerol kit (Roche). Each experiment was repeated three times and average results \pm SD are shown.

Results and discussion

Cell size

The most visible characteristics of a yeast cell are its size and shape. In order to estimate various physiological parameters, we estimated the dry weight, cell size and number of viable cells in 1 ml exponentially growing cultures ($A_{600}=1$) of the five strains. We did not find any marked differences, with the exception of cell size (Figure 1). Our data indicate that, in general, the average cell diameter is in the range 4–6 μ m. Except for *D. hansenii*, all cells were bigger when grown in rich YPD than in minimal YNB. For *P. farinosa* and *S. cerevisiae* this difference was very small, but for both *Z. rouxii* strains growth in YPD resulted in

cells substantially bigger than cells grown in YNB (Figure 1). The reason for the wider distribution of values for both *Z. rouxii* strains in YPD medium (Figure 1) is the clustering of cells in short chains. *D. hansenii* cells were bigger when grown in minimal medium than in rich medium, and they had a significantly longer lag phase and doubling time in comparison with other tested strains growing in YNB (data not shown).

Growth in the presence of osmotic stress

To compare directly the level of osmotolerance of the five tested yeast strains, we first compared their growth in YPD supplemented with 1 M KCl or 1 M NaCl (Figure 2A). This comparison showed us that all tested species tolerate a 1 M solution of KCl, but

not NaCl. *Z. rouxii* CBS 732 and *S. cerevisiae* FL100 were very sensitive to NaCl, which suggested that, although *Z. rouxii* CBS 732 is osmotolerant in general, sodium cations are more toxic for it than for the other three osmotolerant strains. To test the effect of non-toxic solutes in more detail, we used media with a moderate (0.3 M) and high concentration (2 M) of non-toxic KCl, glucose (up to 45%) and sorbitol (up to 30%; not shown). Similar results were obtained with high concentrations of glucose and sorbitol. Both *Z. rouxii* and *D. hansenii* strains grew slightly better on medium with 0.3 M KCl than without any added salt. Surprisingly, *D. hansenii* was sensitive to 2 M KCl, and *Z. rouxii* isolated from grape must (CBS 732) was more inhibited by high glucose in the medium than *Z. rouxii* ATCC 42981 originating from salty food (Figure 2B).

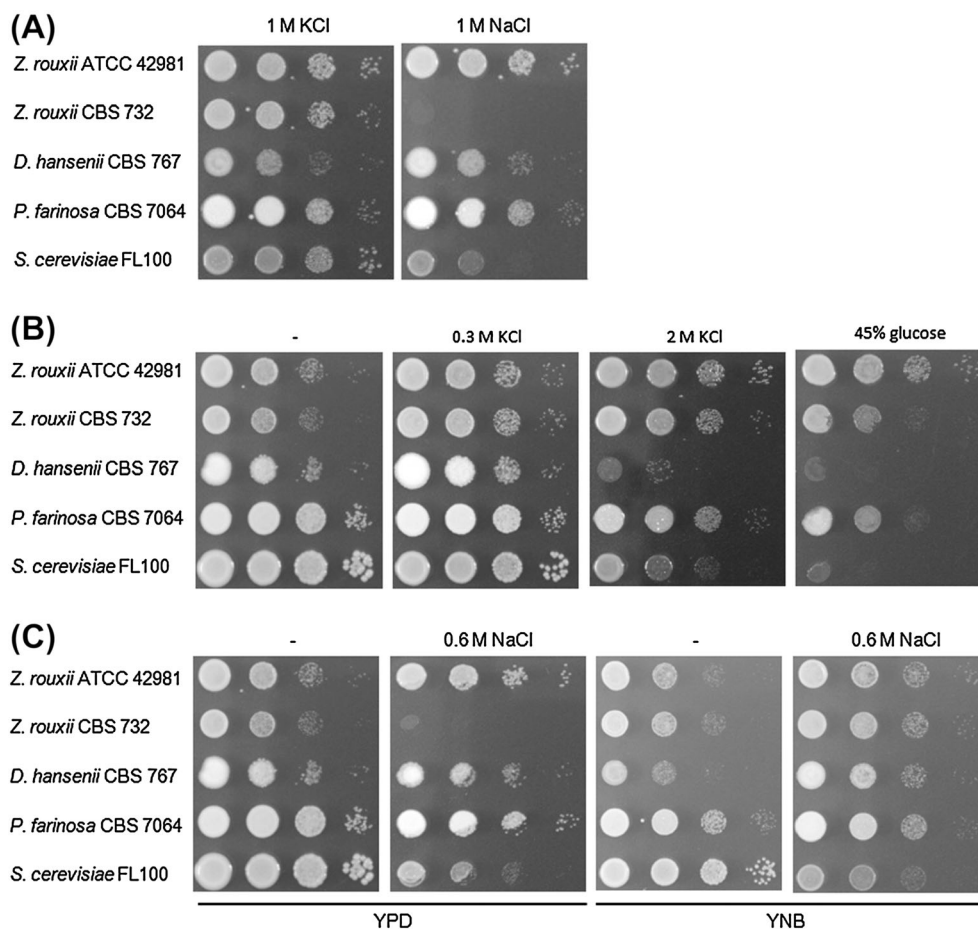


Figure 2. Growth in the presence of salts: (A) growth on solid YPD supplemented with 1 M KCl or NaCl; (B) growth on solid YPD supplemented with KCl or glucose, as indicated; (C) comparison of growth on solid YPD and YNB media supplemented with 0.6 M NaCl

When the same experiments were repeated with minimal YNB media similar results were obtained, i.e. better growth of *Z. rouxii* and *D. hansenii* in the presence of moderate salt concentrations (Figure 2C). On the other hand, surprisingly, *Z. rouxii* CBS 732 was sensitive to 0.6 M NaCl in YPD plates but tolerated the same amount of salt in YNB medium. *P. farinosa* was extremely osmotolerant; its growth was only significantly limited on plates with high salt concentrations (>2 M NaCl or KCl). In this series of experiments, we repeatedly observed that *D. hansenii* grew quite poorly and its osmotolerance was not as high as expected (Figure 2A–C).

To verify whether this was a consequence of the used growth temperature of 30°C, which is supraoptimal for this yeast species (Papoušková

and Sychrova, 2007), we tested the growth of the five strains on YPD plates at various temperatures (18–37°C; Figure 3A) and in the presence of a moderate concentration of NaCl (0.4 M; Figure 3B). Our results showed that, in general, non-conventional species preferred a lower temperature and only *S. cerevisiae* grew very well over the whole temperature range tested. This phenomenon was most significant with *D. hansenii*, whose growth optimum was in the range 18–25 °C. A significant difference in optimal growth temperature was observed between *Z. rouxii* CBS 732 and ATCC 42981. Both strains grew similarly at 25°C, but CBS 732 coped better with 18°C (Figure 3A). When 0.4 M NaCl was added, it significantly improved the growth of *Z. rouxii* ATCC 42981 at 25–37°C (Figure 3B) and also the growth of *D. hansenii* at supraoptimal

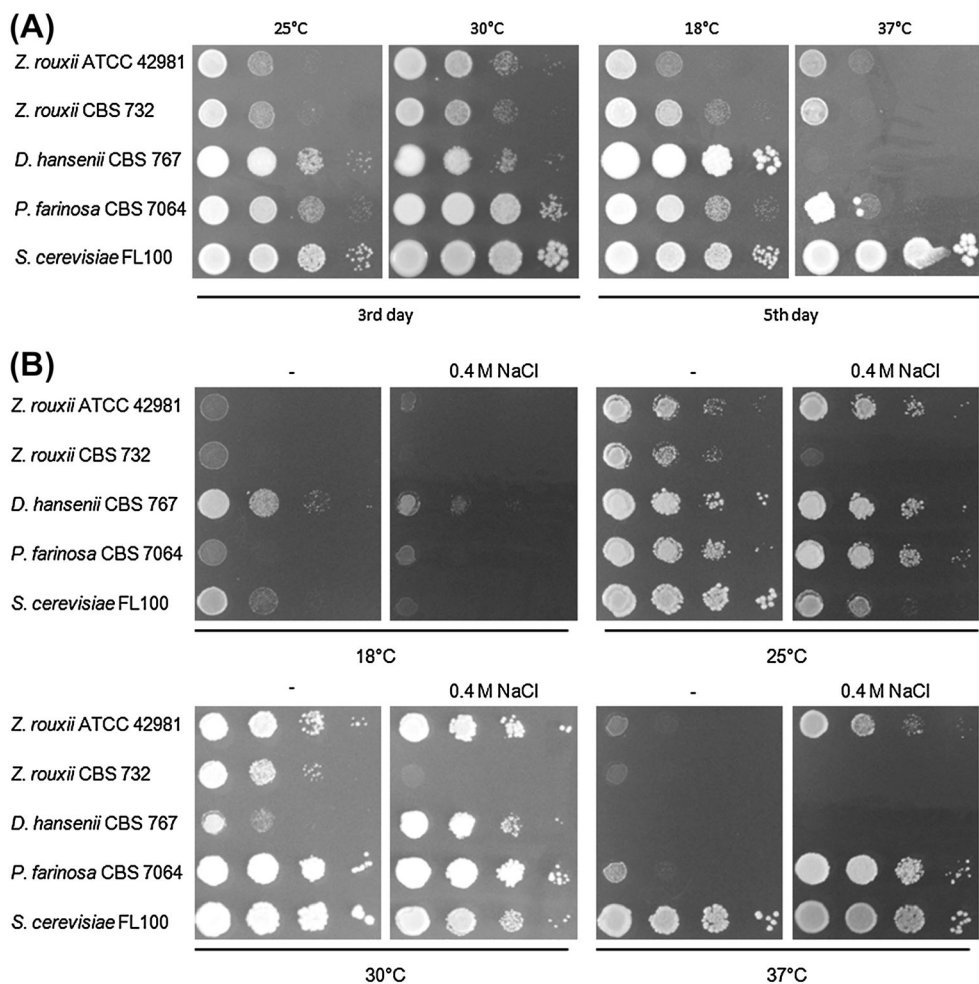


Figure 3. Growth and salt tolerance at various temperatures: (A) growth on solid YPD at the indicated temperatures; (B) effect of 0.4 M NaCl on growth on YPD at the indicated temperatures (after 3 days)

temperatures. In general, the three non-conventional species (*Z. rouxii* ATCC 42981, *D. hansenii* and *P. farinosa*) grew better in the presence of moderate concentrations of salt at supraoptimal temperatures. This phenomenon was observed earlier for other *D. hansenii* strains and also for *S. cerevisiae* or *Schizosaccharomyces pombe* (Papouškova and Sychrova, 2007), and was attributed to a putative cross-protection of two mild stresses (higher temperature and higher salt concentration).

Based on this series of experiments, we decided to perform all subsequent tests at 30°C, although it is not the optimal temperature for *D. hansenii*, and the experiments in which the effect of non-optimal temperature could affect the results were repeated at lower temperature.

Use of non-fermentable carbon sources and glycerol production under standard conditions

The growth of cells in the presence of ethanol and/or glycerol instead of glucose showed that only *S. cerevisiae* FL100 was able to use these two carbon sources (Figure 4), and only *Z. rouxii* ATCC 42981 could grow on glycerol. The ability of *Z. rouxii* ATCC 42981 and *S. cerevisiae* to use glycerol as sole carbon source, and the inability of the other three strains to do so, was confirmed by growth measurements in liquid media (not shown).

As already mentioned, the osmotolerant yeasts are thought to more effectively reach the necessary glycerol intracellular concentrations and produce less total glycerol upon osmotic stress (Lages *et al.*, 1999; Van Eck *et al.*, 1993). We wanted to know whether the osmotolerant species produce different amounts of glycerol than *S. cerevisiae* under standard conditions, i.e. when grown in YPD without osmotic stress. Figure 5 shows that only *Z. rouxii* ATCC 42981 produced a higher amount of glycerol (almost 0.6 mg/ml) under non-stressed

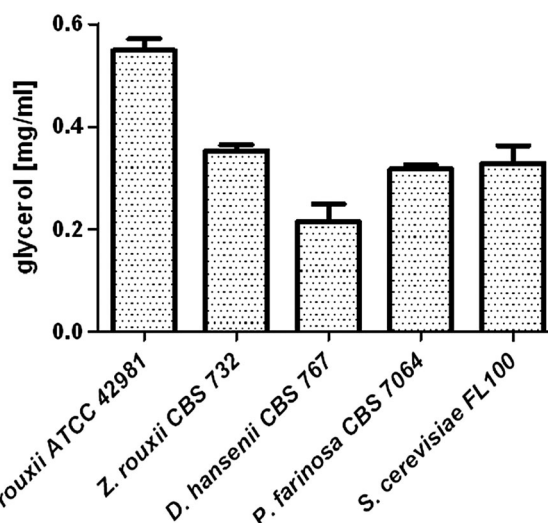


Figure 5. Glycerol production under standard growth conditions: the glycerol content was estimated in YPD cultures of $A_{600} = 1$; results represent the amount of glycerol in 1 ml cell culture; average results of three independent experiments \pm SD are presented

conditions. The glycerol production of the other strains was similar and around ca. 0.3 mg/ml of culture. *D. hansenii* exhibited a slightly lower glycerol production. This could be caused by its lower need or by a high number of putative glycerol transport systems and subsequently higher level of glycerol uptake (Lucas *et al.*, 1990; Palma *et al.*, 2007).

Resistance to toxic cations, cationic drugs and plasma-membrane potential

When we tested the tolerance of cells to toxic Li^+ , we observed surprising differences (Figure 6A). *Z. rouxii* CBS 732 was highly sensitive even to a low amount of LiCl, whereas the other *Z. rouxii* strain (ATCC 42981) could grow in the presence of high LiCl concentrations. The *D. hansenii* cells were

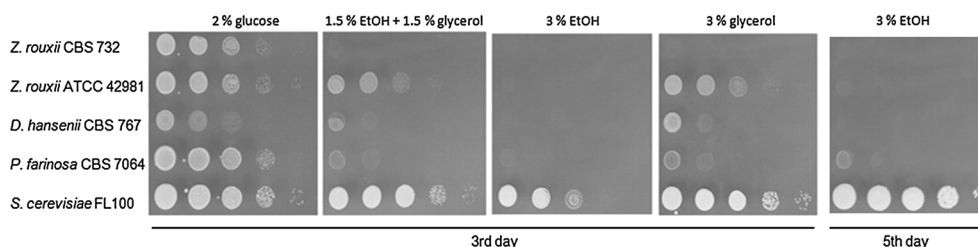


Figure 4. Use of non-fermentable carbon sources: growth on solid YPD supplemented with the indicated carbon sources

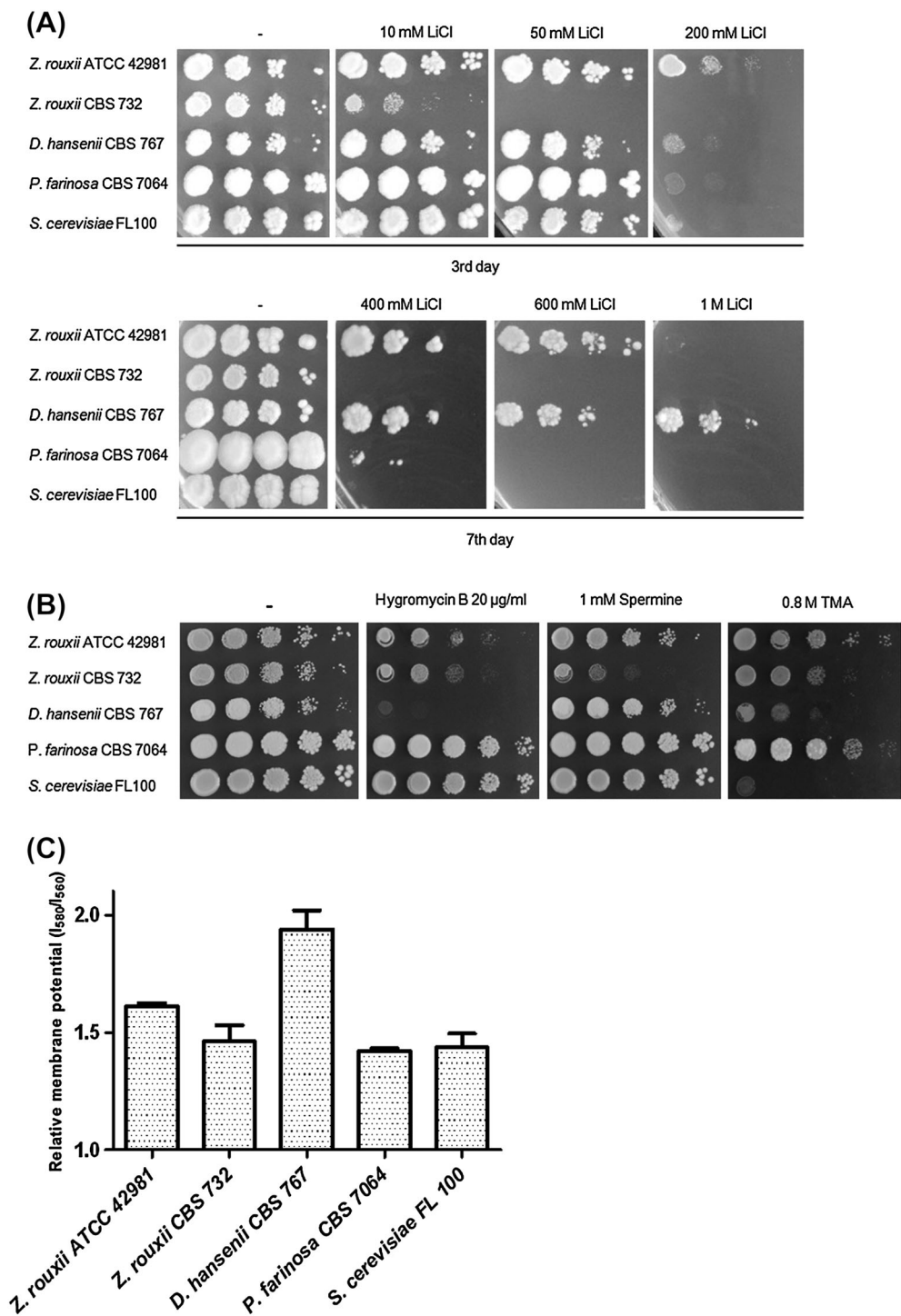


Figure 6. Effect of toxic cations, cationic drugs and estimation of relative membrane potential: growth on solid YPD plates with various concentration of: (A) lithium chloride; (B) hygromycin B, spermine and TMA; (C) relative membrane potential of cells grown in liquid YPD to the mid-exponential phase; average results of three independent experiments ± SD are presented

also extremely tolerant to LiCl (up to 1 M). This result suggested two things. First, the observed sensitivity of *Z. rouxii* CBS 732 to toxic alkali metal cations (Na^+ and Li^+ , Figures 2A and 6A) could be due to a decreased ability to export or sequester these cations; and, vice versa, the high lithium tolerance of *Z. rouxii* ATCC 42981 and *D. hansenii* could be caused by a very effective system for lithium efflux. In general, there are two types of active alkali-metal-cation exporters in the plasma membrane of yeast; an ATPase and an antiporter (Ramos *et al.*, 2011). In *S. cerevisiae*, the most powerful system to export toxic alkali metal cations is the Ena ATPase, and the Nha1 antiporter plays a less significant role in cation detoxification (Arino *et al.*, 2010). A cation, ATPase, has not yet been characterized in *Z. rouxii* CBS 732. In this strain, only one antiporter exporting Na^+ and Li^+ has been described (Pribylova *et al.*, 2008). The exporters for cations in *Z. rouxii* ATCC 42981 have not yet been studied, but both efficient ATPases and an antiporter have been described in *D. hansenii*, (Almagro *et al.*, 2001; Velkova and Sychrova, 2006).

Second, the differences in lithium tolerances can result from a difference in the plasma-membrane potential, which serves as the driving force for the influx of cations and cationic drugs. To elucidate whether the observed differences in lithium tolerance could be attributed to an increased potential-driven influx of Li^+ into the cells, we tested the tolerance of cells to various cationic drugs. These three drugs, hygromycin B, spermine and tetramethylammonium (TMA), affect yeast cells in different ways and thus a simultaneously increased tolerance/sensitivity to all these drugs suggests a difference in membrane potential (Barreto *et al.*, 2011). As shown in Figure 6B, *Z.*

rouxii ATCC 42981 was slightly more tolerant to cationic drugs than *Z. rouxii* CBS 732. Also, *P. sorbitophila* was quite tolerant to cationic drugs, in contrast to its relative sensitivity to LiCl (Figure 6A). *D. hansenii* cells were very sensitive to hygromycin B at both 30°C and optimal temperature (ca. 25°C; see supporting information, Figure S1), which was in contrast to their high Li^+ tolerance (Figure 6A). Finally, we estimated the relative membrane potential of cells growing in YPD (Figure 6C). Our results showed that, except for *D. hansenii*, all the other four strains might have a similar membrane potential. With *D. hansenii*, we observed significant hyperpolarization compared to the other strains. The staining curves obtained for *D. hansenii* (not shown) were more similar to those of *Candida* species (Elicharova and Sychrova, 2013) than to those of *S. cerevisiae*, which probably reflected their phylogenetic proximity. The observed relative hyperpolarization of the *D. hansenii* plasma membrane confirmed, on the one hand, the results from drop tests in the presence of cationic drugs, mainly hygromycin B (Figure 6B), and on the other hand, suggested that the high lithium tolerance of *D. hansenii* cells resulted from the presence of an efficient Li^+ -detoxifying (export?) mechanism.

Resistance to oxidative stress

We also compared the resistance of yeasts to an oxidative stress caused by the presence of H_2O_2 , and again, we found some differences among the species. In this experiment, *D. hansenii* strain was quite sensitive to oxidative stress, whereas other strains tolerated the used peroxide concentrations quite well, and *Z. rouxii* ATCC 42981 was the most tolerant (Figure 7).

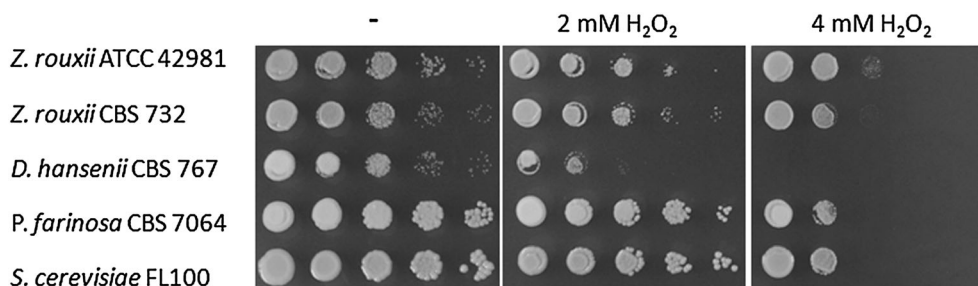


Figure 7. Growth upon oxidative stress: growth on solid YPD supplemented with the indicated concentrations of H_2O_2

Survival of anhydrobiotic stress

In a further experiment, we tested the ability of the studied species to survive dehydration and subsequent rehydration. Drying and rehydration are the sum of several stresses, which include oxidative and osmotic stresses in addition to temperature stress (Guzhova *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2003; Potts, 1994). *Z. rouxii* CBS 732 was relatively sensitive to hyperosmotic stress and also to oxidative stress and, as shown in Figure 8, this strain also did not survive our experimental desiccation conditions. The other strains were more resistant to the dehydration/rehydration procedure, and it was *P. farinosa* that seemed to be best adapted to anhydrobiosis (Figure 8).

Intracellular concentration of K⁺

Another crucial physiological parameter of yeast cells is their potassium content and homeostasis, which help to regulate cell volume, intracellular pH and plasma-membrane potential and survive various types of stresses. We measured the intracellular concentration of potassium in cells growing in standard non-stressed conditions, i.e. in YPD medium (Figure 9). Surprisingly, we found substantial differences among the strains, even for this parameter. *S.*

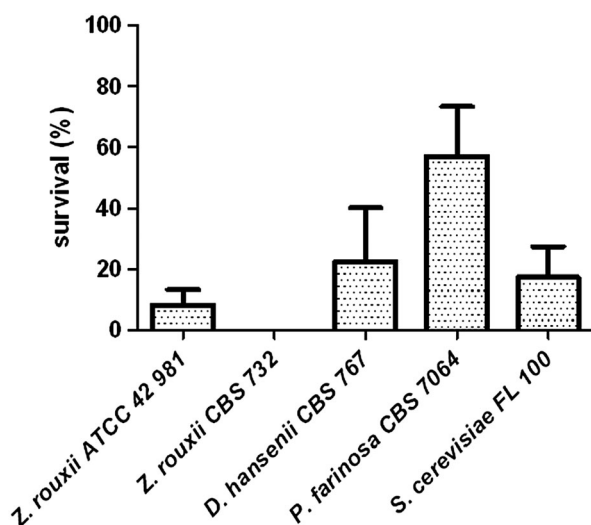


Figure 8. Survival of anhydrobiosis: cells from the stationary phase of growth in liquid YPD were dehydrated at 30°C for 12 h, then rehydrated in water at room temperature for 10 min; the viability of cells (percentage survival, determined as cfu) \pm SD is shown

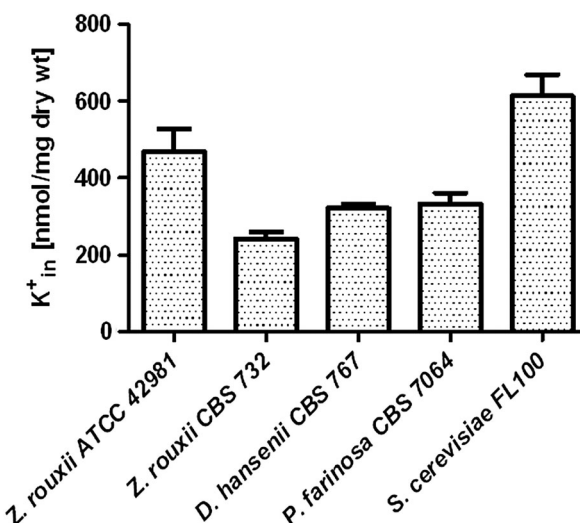


Figure 9. Intracellular concentration of potassium: K⁺ content was measured in cells exponentially growing in YPD; average results of three independent experiments \pm SD are presented

cerevisiae FL100 had the highest intracellular concentration of potassium (613 \pm 55 nmol/mg dry weight) compared to the other species. It is worth noting that there was almost no difference in potassium content between *D. hansenii* (321 \pm 12 nmol K⁺/mg dry weight) and *P. farinosa* (332 \pm 30 nmol/mg dry weight), although the two species differed significantly in many tolerance tests.

Growth on limited concentration of K⁺

As mentioned above, the optimal potassium concentration is essential for many physiological functions and cells must accumulate lot of potassium to reach the intracellular concentrations necessary for cell growth and division (>200 nmol/mg dry weight; Figure 9). We tested the ability of strains to grow on YNB-F plates supplemented with K⁺ in the range 15 μ M–500 mM. As shown in Figure 10, the only species that could grow very well at extremely low potassium concentrations was *P. farinosa*. On the other hand, *S. cerevisiae*, *Z. rouxii* CBS 732 and *D. hansenii* needed at least 1 mM KCl to start to grow properly. The sensitivity of *Z. rouxii* 732 to potassium limitation can be caused by the presence of only one potassium uptake system in this species (Stribny *et al.*, 2012). The slightly inhibited growth of *D. hansenii* at all tested concentrations was probably caused by the supraoptimal temperature as this

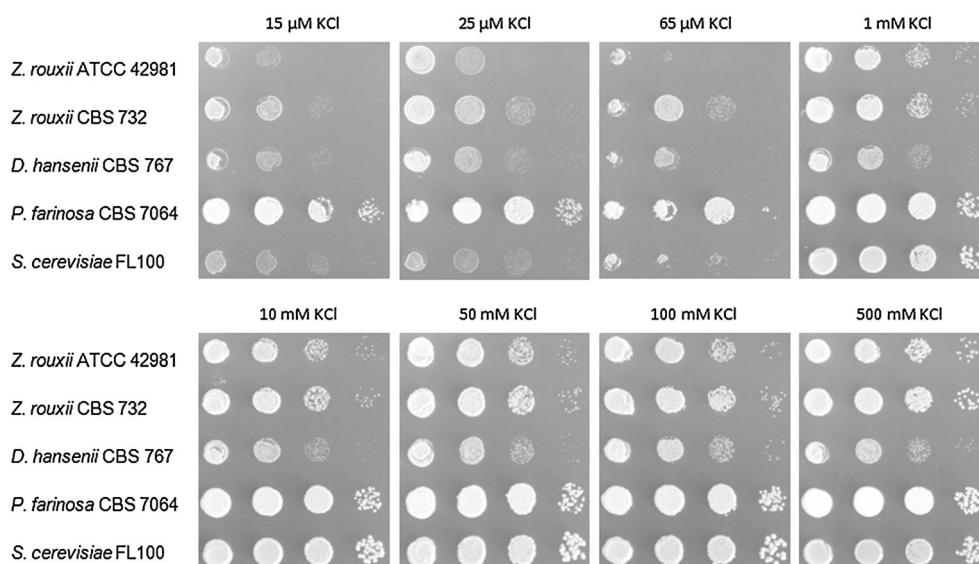


Figure 10. Growth upon potassium limitation: growth on solid K^+ -free YNB-F supplemented with various KCl concentrations

species has two efficient potassium uptake systems (Prista *et al.*, 2007).

Comparison of physiology parameters, stress tolerance and growth properties

In this work, we compared the physiological and growth parameters of three non-conventional osmotolerant yeast species that differ in their original niche and level of osmotolerance, with the aim of summarizing potentially important information for their future employment. Although all four strains of the three studied species (*Z. rouxii*, *D. hansenii* and *P. farinosa*) were in general more osmotolerant than *S. cerevisiae* (Figures 2 and 3), the *Z. rouxii* CBS 732 cells were much more sensitive to higher concentrations of NaCl and LiCl (Figures 2A, 6A) than the others. The relative membrane potential of this strain was not higher than that of the other strains (Figure 6C), and thus a higher non-specific influx of these cations, driven by the plasma-membrane potential, may be excluded. As *Z. rouxii* CBS 732 cells contained a relatively low amount of potassium cations (Figure 9) and needed quite a high potassium concentration in the medium for efficient growth (Figure 10), as a consequence of having only one active high-affinity potassium uptake system (Stribny *et al.*, 2012), we conclude that *Z. rouxii* CBS 732 is sodium and lithium sensitive due to its lower ability to maintain optimally high intracellular $K^+Na^+(Li^+)$ ratio

(Arino *et al.*, 2010) in the presence of NaCl or LiCl. This strain is also highly sensitive to other types of stresses, e.g. anhydrobiosis (Figure 8), which is in contrast to its close relative *Z. rouxii* ATCC 42981.

On the other hand, *D. hansenii* cells were highly resistant to Li^+ cations (Figure 6A), even though this yeast species has a higher plasma-membrane potential than the other species (Figure 6C) and, due to this relative hyperpolarization, it is sensitive to cationic drugs (Figure 6B). Our results suggest that *D. hansenii* has a very efficient system to eliminate toxic lithium cations. We know from our previous study that the *D. hansenii* cation/proton antiporter Nha1 is not extremely efficient at transporting Li^+ cations (Velkova and Sychrova, 2006), and thus the high lithium tolerance is most probably connected to the activity of the two *D. hansenii* Ena ATPases (Almagro *et al.*, 2001).

Surprisingly, our results showed that for each of the three tested cationic drugs, another yeast species was the most sensitive (Figure 6B; *D. hansenii*, hygromycin B; *Z. rouxii* CBS 732, spermine; *S. cerevisiae*, TMA). This observation somehow enfeebles the generally accepted view that the sensitivity/tolerance to these three drugs reflects the level of membrane potential, and points to the fact that the activity of detoxification mechanisms for individual drugs differ in the four yeast species.

Among the studied species, *P. farinosa* CBS 7064 was the most robust strain in the majority of our tests. It tolerated high concentrations of

sugars, polyols and salts well; it survived anhydrobiosis, oxidative stress, the presence of cationic toxic drugs or potassium limitation quite well. Simultaneously, its basic physiological parameters, such as cell size, rate of growth, membrane potential or potassium content, were not significantly different from those of the model non-tolerant yeast *S. cerevisiae*.

Though some of the osmotolerant yeast species are often thought to be osmophilic (e.g. *D. hansenii*; Prista et al., 1997), our experiments did not find genuine osmophily with any of the tested strains. Although we observed better growth upon the addition of a moderate concentration of salt under some conditions (e.g. Figures 2C, 3B), this phenomenon was only ever observed when the tests were performed at temperatures supraoptimal for the growth of individual strains (Figure 3). Our results confirmed an earlier observation (Almagro et al., 2000; Papouskova and Sychrova, 2007), that a combination of mild temperature and salt stresses improves the growth of yeast cells.

Conclusion

Taken together, our results showed that some osmotolerant species are more robust when coping with various stresses than others, that some of the species isolated as sugar/polyol-tolerant (*P. farinosa*) are also highly tolerant to salts and other stresses and, vice versa, some strains isolated from a salty environment (*Z. rouxii* ATCC 42981) tolerate high concentrations of sugars (e.g. Figure 2B). A comparison of physiological parameters and growth capacity both under standard and stressed conditions revealed important differences among the osmotolerant strains and species, and we believe that our results may contribute to the future selection of appropriate osmotolerant strains and species for improving the productivity of various yeast-related biotechnology processes.

Acknowledgements

This study was supported by Grant Agency of the Czech Republic P503/10/0307, Institutional concept RVO 6798582, Grant Agency of the Charles University in Prague

29961/2011/B-BioPrF and the European Union (Grant No. EU ITN-264717 Cornucopia).

References

- Almagro A, Prista C, Benito B, et al. 2001. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Bacteriol* **183**: 3251–3255.
- Almagro A, Prista C, Castro S, et al. 2000. Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *Int J Food Microbiol* **56**: 191–197.
- Arino J, Ramos J, Sychrová H. 2010. Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 95–120.
- Barreto L, Canadell D, Petrežselyova S, et al. 2011. A genome-wide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **10**: 1241–1250.
- Borovikova D, Herynkova P, Rapoport A, Sychrová H. 2014. Potassium uptake system Trk2 is crucial for yeast cell viability during anhydrobiosis. *FEMS Microbiol Lett* **350**: 28–33.
- Breuer U, Harms H. 2006. *Debaryomyces hansenii* – an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* **23**: 415–437.
- Butinar L, Santos S, Spencer-Martins I, et al. 2005. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett* **244**: 229–234.
- de Miranda LR, Appel KR, Seyfarth M. 1980. *Pichia sorbitofila* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* **46**: 157–159.
- Denksteinova B, Gaskova D, Herman P, et al. 1997. Monitoring of membrane potential changes in *Saccharomyces cerevisiae* by diS-C-3(3) fluorescence. *Folia Microbiol* **42**: 221–224.
- Elcharova H, Sychrová H. 2013. Fluconazole treatment hyperpolarizes the plasma membrane of *Candida* cells. *Med Mycol* **51**: 785–794.
- Fleet G. 1992. Spoilage yeasts. *Crit Rev Biotechnol* **12**: 1–44.
- Gordon JL, Wolfe KH. 2008. Recent allopolyploid origin of *Zygosaccharomyces rouxii* strain ATCC 42981. *Yeast* **25**: 449–456.
- Guzhova I, Krallish I, Khroustalyova G, et al. 2008. Dehydration of yeast: changes in the intracellular content of Hsp70 family proteins. *Proc Biochem* **43**: 1138–1141.
- Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300–372.
- Jermine MFG, Schmidt-Lorenz W. 1987. Activity of sodium benzoate and ethylparaben against osmotolerant yeasts at different water activity values. *J Food Prot* **50**: 920–926.
- Kinclova O, Ramos J, Potier S, Sychrova H. 2001. Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol Microbiol* **40**: 656–668.
- Kiuchi K, Suzuki O, Ohta T. 1978. Isolation of halotolerant yeasts capable of assimilating linoleate in miso. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **25**: 508–514.
- Kurtzman CP. 1990. DNA relatedness among species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Yeast* **6**: 213–219.
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. 2010. The Yeasts: A Taxonomic Study. Elsevier: Amsterdam.
- Lages F, Lucas C. 1994. Glycerol/H⁺ symport in the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila* – characterization of an electrogenic active-transport system. *Folia Microbiol* **39**: 528–529.
- Lages F, Lucas C. 1995. Characterization of a glycerol/H⁺ symport in the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila*. *Yeast* **11**: 111–119.

- Lages F, Silva-Graca M, Lucas C. 1999. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiol* **145**(9): 2577–2585.
- Leandro MJ, Fonseca C, Goncalves P. 2009. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. *FEMS Yeast Res* **9**: 511–525.
- Lucas C, Dacosta M, Vanuden N. 1990. Osmoregulatory active sodium glycerol cotransport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **6**: 187–191.
- Malac J, Urbankova E, Sigler K, Gaskova D. 2005. Activity of yeast multidrug resistance pumps during growth is controlled by carbon source and the composition of growth-depleted medium: DiS-C3(3) fluorescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 2536–2543.
- Maresova L, Muend S, Zhang YQ, *et al.* 2009. Membrane hyperpolarization drives cation influx and fungicidal activity of amiodarone. *J Biol Chem* **284**: 2795–2802.
- Maresova L, Sychrová H. 2003. Physiological characterization of osmotolerant yeast *Pichia sorbitophila* and comparison with a putative synonym *Pichia farinosa*. *Folia Microbiol* **48**: 211–217.
- Maresova L, Sychrová H. 2007. Applications of a microplate reader in yeast physiology research. *Biotechniques* **43**: 667–672.
- Martorell P, Stratford M, Steels H, *et al.* 2007. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *Int J Food Microbiol* **114**: 234–242.
- Michan C, Martinez JL, Alvarez MC, *et al.* 2013. Salt and oxidative stress tolerance in *Debaryomyces hansenii* and *Debaryomyces fabryi*. *FEMS Yeast Res* **13**: 180–188.
- Onishi H. 1963. Osmophilic yeasts. *Adv Food Res* **12**: 53–94.
- Palma M, Goffeau A, Spencer-Martins I, Baret PV. 2007. A phylogenetic analysis of the sugar porters in hemiascomycetous yeasts. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**: 241–248.
- Papouskova K, Sychrova H. 2007. The co-action of osmotic and high temperature stresses results in a growth improvement of *Debaryomyces hansenii* cells. *Int J Food Microbiol* **118**: 1–7.
- Pereira EJ, Panek AD, Eleutherio ECA. 2003. Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell Stress Chaperons* **8**: 120–124.
- Potts M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* **58**: 755–805.
- Pribylova L, de Montigny J, Sychrová H. 2007a. Osmoresistant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: the two most studied wild-type strains (ATCC 2623 and ATCC 42981) differ in osmotolerance and glycerol metabolism. *Yeast* **24**: 171–180.
- Pribylova L, Farkas V, Slaninova I, *et al.* 2007b. Differences in osmotolerant and cell-wall properties of two *Zygosaccharomyces rouxii* strains. *Folia Microbiol* **52**: 241–245.
- Pribylova L, Papouskova K, Sychrová H. 2008. The salt tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* possesses two plasma-membrane Na⁺/H⁺-antiporters (ZrNha1p and ZrSod2–22p) playing different roles in cation homeostasis and cell physiology. *Fung Genet Biol* **45**: 1439–1447.
- Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4005–4009.
- Prista C, Gonzalez-Hernandez JC, Ramos J, Loureiro-Dias MC. 2007. Cloning and characterization of two K⁺ transporters of *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* **153**: 3034–3043.
- Prista C, Loureiro-Dias MC, Montiel V, *et al.* 2005. Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* **5**: 693–701.
- Ramos J, Arino J, Sychrová H. 2011. Alkali–metal–cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiol Lett* **317**: 1–8.
- Rosa C, Gabor P. (2006). The Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer-Verlag: Heidelberg.
- Sherman DJ, Martin T, Nikolski M, *et al.* 2009. Génolevures: protein families and syntenies among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acids Res* **37**(database issue): D550–554.
- Solieri L, Giudici P. 2008. Yeasts associated to traditional balsamic vinegar: ecological and technological features. *Int J Food Microbiol* **125**: 36–45.
- Stribny J, Kinclova-Zimmermannova O, Sychrová H. 2012. Potassium supply and homeostasis in the osmotolerant non-conventional yeast *Zygosaccharomyces rouxii* differ from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **58**: 255–264.
- Thome PE. 2007. Cell wall involvement in the glycerol response to high osmolarity in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **91**: 229–235.
- Van Eck JH, Prior BA, Brandt EV. 1993. The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *J Gen Microbiol* **139**: 1047–1054.
- Velkova K, Sychrová H. 2006. The *Debaryomyces hansenii* NHA1 gene encodes a plasma membrane alkali–metal–cation antiporter with broad substrate specificity. *Gene* **369**: 27–34.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

Figure S1. Effect of cationic drugs on the growth of cells at 25°C: growth on solid YPD was supplemented with hygromycin B, spermine and TMA at 25°C for 2 days.

Supplementary Information

Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses

Michala Dušková^{1,2}, Jana Zemančíková¹, Hana Sychrová^{1*}

¹Department of Membrane Transport, Institute of Physiology Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, 128 43, Prague 2, Czech Republic

*Corresponding author:

Hana Sychrová

Inst. Physiology AS CR

Videnska 1083

14220 Prague 4

Czech Republic

Tel: + 420 241 062 667

+ 420 241 062 488

E-mail nychrova@biomed.cas.cz

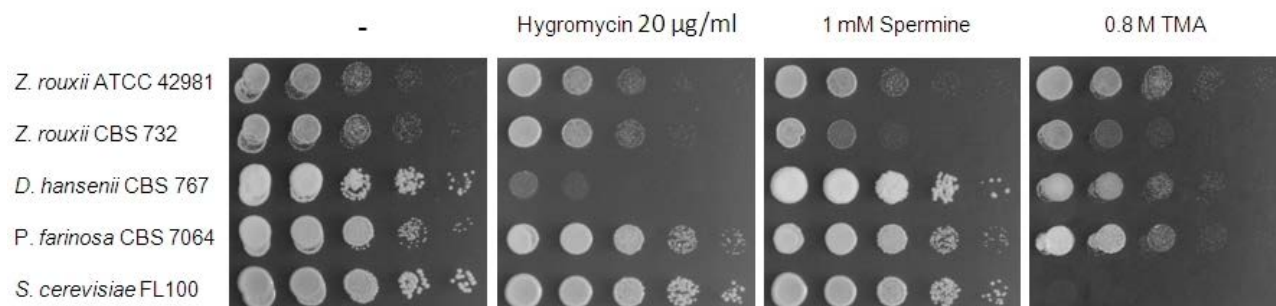


Figure S1. Effect of cationic drugs on the growth of cells at 25°C: growth on solid YPD was supplemented with hygromycin B, spermine and TMA at 25°C for 2 days.

4.2 Publikace č. 2 - The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions.

Saccharomyces cerevisiae je nositelem dvou transportérů glycerolu. Prvním z nich je kanál ScFps1 a druhým je ScStl1. Funkce obou těchto systémů je regulována terminální kinasou dráhy HOG, ScHog1. Regulace probíhá jak na úrovni exprese (ScStl1), tak na úrovni funkce samotných proteinů (ScFps1). Odhalení příspěvku těchto tří proteinů k fyziologickým vlastnostem *S. cerevisiae* BY4741 bylo dalším z úkolů předkládané dizertační práce, který je zpracován v této publikaci. Součástí práce byla konstrukce unikátní série kmenů zahrnující jednoduché mutantní kmeny postrádající geny *ScSTL1*, *ScFPS1* a *ScHOG1*, následně pak dvojité mutanty *hog1Δ stl1Δ*, *stl1Δ fps1Δ* a trojitý mutantní kmen *hog1Δ stl1Δ fps1Δ* postrádající všechny tři studované proteiny.

I přestože kmen *hog1Δ stl1Δ fps1Δ*, není schopen aktivně akumulovat glycerol z okolí, rychle vypustit přebytek glycerolu v případě náhlého poklesu osmolarity a není ani schopen jeho zvýšené syntézy, růst tohoto kmene na bohatém médiu bez stresu je pouze mírně zhoršen. Letální účinek mnohonásobné delece a především pak delece genu *ScHOG1* se však začíná velice rychle projevovat se zvyšující se koncentrací osmoticky aktivních látek v prostředí. Delece genu *ScHOG1* naopak významně zlepšuje přežívání hyperosmotického a následného hypoosmotického stresu, v porovnání s jednoduchými mutantními kmeny *fps1Δ* a *stl1Δ*. Překvapující bylo také zjištění, že buňky postrádající gen *ScSTL1* snáší hůře vystavení hypoosmotickým podmínkám, v porovnání s buňkami bez kanálu ScFps1. V rámci studie bylo také odhaleno, že přenašeč ScStl1 je pravděpodobně pouze částečně inaktivován glukosou v *S. cerevisiae* BY4741. Tato skutečnost byla potvrzena studiem lokalizace proteinu ScStl1-GFP, který se nachází jak v membráně, tak ve vakuolách buněk pěstovaných v médiu s glukosou. Buňky rostoucí v glukosovém médiu a postrádající přenašeč ScStl1 mají dále také, v porovnání s buňkami nesoucími funkční gen *ScSTL1*, vyšší vnitrobuněčné pH a celkovou velikost. Všechna tato pozorování společně s předchozími poznatky odhalila význam metabolismu glycerolu i při nestresových podmínkách a současně také vyzdvihla význam přenašeče ScStl1 pro fyziologii *S. cerevisiae*.

Dušková, M., D. Borovikova, P. Herynková, A. Rapoport & H. Sychrová, (2015) The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions. *FEMS Microbiol Lett* **362**: 1-8.

RESEARCH LETTER – Physiology & Biochemistry

The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions

Michala Duskova¹, Diana Borovikova², Pavla Herynkova¹, Alexander Rapoport² and Hana Sychrova^{1,*}

¹Department of Membrane Transport, Institute of Physiology Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Videnska 1083, 14220 Prague, Czech Republic and ²Laboratory of Cell Biology, Institute of Microbiology and Biotechnology, University of Latvia, LV-1586 Riga, Latvia

*Corresponding author: Department of Membrane Transport, Institute of Physiology AS CR, Videnska 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic.

Tel: 420-241062556; Fax: 420-241062488; E-mail: sychrova@biomed.cas.cz

One sentence summary: Role of yeast glycerol transporters in stress survival.

Editor: Michael Sauer

ABSTRACT

Small and uncharged glycerol is an important molecule for yeast metabolism and osmoadaptation. Using a series of *S. cerevisiae* BY4741-derived mutants lacking genes encoding a glycerol exporter (Fps1p) and/or importer (Stl1p) and/or the last kinase of the HOG pathway (Hog1p), we studied their phenotypes and various physiological characteristics with the aim of finding new roles for glycerol transporters. Though the triple mutant *hog1Δ stl1Δ fps1Δ* was viable, it was highly sensitive to various stresses. Our results showed that the function of both Stl1p and Fps1p transporters contributes to the cell ability to survive during the transfer into the state of anhydrobiosis, and that the deletion of *FPS1* decreases the cell's tolerance of hyperosmotic stress. The deletion of *STL1* results in a slight increase in cell size and in a substantial increase in intracellular pH. Taken together, our results suggest that the fluxes of glycerol in both directions across the plasma membrane exist in yeast cells simultaneously, and the export or import predominates according to the actual specific conditions.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; glycerol transport; desiccation; osmotic stress

INTRODUCTION

Glycerol is the main osmoprotectant in most yeast species, including *Saccharomyces cerevisiae* (Hohmann 2002). It can also serve as a source of carbon, and the cytosolic level of its degradation/synthesis is an important factor in the maintenance of the cell redox balance (Ansell et al., 1997; Valadi et al., 2004). Besides these functions, glycerol is also used for the synthesis of glycerophospholipids and triacylglycerols (Kohlwein et al., 1996; Mullner and Daum 2004), and it serves in oxidative or heat stress protection (Pahlman et al., 2001). To maintain optimal glycerol levels under changing external conditions and available nutrients, yeast cells tightly regulate glycerol synthesis, degradation

and transport. Upon high external osmotic pressure, when the intracellular osmotic pressure needs to be increased, the high osmolarity glycerol (HOG) pathway signals to cells the need to increase the synthesis of glycerol and its uptake from the environment and diminish its loss from cells. It is the last kinase of this pathway (Hog1p) that is crucial for both the immediate and late responses of cells to hyperosmotic stress. It activates or inactivates various transporters and enzymes (e.g. the Nha1p cation/proton antiporter or K⁺ channel Tok1p (Proft and Struhl 2004; Kinclova-Zimmermannova and Sychrova 2006; Westfall et al., 2008), or provokes the necessary transcriptional and translational changes (Albertyn et al., 1994; Proft and Struhl

2004), e.g. in glycerol and sugar metabolism (Posas et al., 2000) or in the cell cycle (Escote et al., 2004; Clotet et al., 2006). Last but not least, Hog1p upregulates the synthesis of the glycerol uptake system Stl1p and inactivates the glycerol exporting channel Fps1p.

Upon osmotic stress, glycerol is massively synthesized *de novo* from dihydroxyacetone-P via glycerol-3-P in a Hog1-dependent manner (Albertyn et al., 1994). As a small and uncharged molecule, glycerol can easily penetrate lipid membranes and thus it is lost from cells by a passive diffusion following its concentration gradient. *Saccharomyces cerevisiae* and other yeast species have a transporter that is able to actively accumulate glycerol from the environment due to the proton-symport mechanism utilizing the inward gradient of protons across the plasma membrane generated by the Pma1p H⁺-ATPase (Ferreira et al., 2005). This transporter is structurally related to the family of hexose transporters within the major facilitator superfamily, as is evident from its name (sugar transporter-like). The *STL1* gene is repressed and Stl1 protein inactivated in the *S. cerevisiae* W303 background (Ferreira et al., 2005) in the presence of glucose, i.e. under conditions where glycerol does not serve as a preferable source of carbon and energy. On the other hand, glucose-mediated repression is overcome under various conditions when the uptake of glycerol is an advantage, e.g. upon osmotic stress (Lages and Lucas 1997; Ferreira et al., 2005) via HOG-mediated induction (Rep et al., 2000), at high temperature (Ferreira and Lucas 2007) or during cold adaptation (Tulha et al., 2010). Evidently, Stl1p is also expressed and active when the cells grow on non-fermentable carbon sources (Rep et al., 2000; Haurie et al., 2001) and during entry to the stationary phase (Lages and Lucas 1997; Holst et al., 2000; Haurie et al., 2001).

The Fps1p channel that mediates a rapid release of glycerol from the cytosol by facilitated diffusion is mainly used when cells need to quickly diminish their intracellular turgor and increase their intracellular water activity. Fps1p is a member of the major intrinsic protein family and besides glycerol, it facilitates the diffusion of other small solutes across the plasma membrane (Ahmadpour et al., 2014). Fps1p is also required for cell fusion during yeast mating (Philips and Herskowitz 1997). A hyperosmotic environment causes Fps1p closure (Hog1p mediated), whereas a decrease in external osmolarity results in a reactivation/opening of this channel (Tamas et al., 1999).

Besides the Stl1 and Fps1 transporters, three other proteins and/or ORFs were initially described as glycerol transporters. However, later studies did not confirm their glycerol transporting activities. Gup1 and Gup2 proteins were later described as O-acyltransferases (Neves, Lages and Lucas 2004; Tulha et al., 2012) and the Fps1-like protein Yfl054c has never been shown to act as a standard glycerol channel (Wysocki et al., 2001; Oliveira et al., 2003; Ahmadpour et al., 2014).

Although there have been many studies characterizing *S. cerevisiae* single mutants lacking *HOG1*, *FPS1* or *STL1* genes, or proving the regulatory effect of Hog1p on Stl1p or Fps1p with the use of double *hog1Δstl1Δ* and *hog1Δfps1Δ* mutants, much less attention has been paid to the characterization of mutants lacking both glycerol export and import mechanisms and the ability to increase glycerol synthesis when necessary. In this work, we constructed a series of single, double and triple mutants in the BY4741 background, characterized their growth properties and physiological characteristics and for the first time revealed some new and interesting phenotypes or functions, e.g. the role of both transporters in the cell survival during its transfer into the state of anhydrobiosis and back to active life or the contribution of Stl1p to the maintenance of pH homeostasis.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains, plasmids and growth media

The *S. cerevisiae* strains and plasmids used are listed in Table 1. Deletion mutants were prepared by homologous recombination using the Cre-loxP system repeatedly (Guldener et al., 1996) in the BY4741 strain (MATa *his3Δ leu2Δ met15Δ ura3Δ*; EUROSCARF). The oligonucleotides used for the construction of deletion cassettes and for diagnosis are listed in Table 2.

Strains were routinely grown in standard liquid YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) in an orbital shaker at 160 rpm/min at 30°C. For some experiments, 2% glucose was replaced with 2% mannitol or 1 M mannitol (YPM and YP+1M mannitol, respectively; indicated in the text). For the measurement of intracellular pH, YNB-pH medium [0.17% YNB w/o ammonium sulphate, w/o folic acid, w/o riboflavin (MP Biomedicals); 0.4% ammonium sulphate] supplemented with 2% glucose and BSM w/o uracil (Brand Supplement Mix, Formedium™, UK)

Table 1. *Saccharomyces cerevisiae* strains and plasmids used in this study.

Strains		
BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF, Germany
<i>hog1Δ</i>	BY4741 <i>hog1Δ::loxP</i>	This study
<i>stl1Δ</i>	BY4741 <i>stl1Δ::loxP</i>	This study
<i>fps1Δ</i>	BY4741 <i>fps1Δ::loxP</i>	This study
<i>hog1Δ stl1Δ</i>	BY4741 <i>hog1Δ::loxP stl1Δ::kanMX</i>	This study
<i>stl1Δ fps1Δ</i>	BY4741 <i>stl1Δ::loxP fps1Δ::loxP</i>	This study
<i>hog1Δ stl1Δ fps1Δ</i>	BY4741 <i>hog1Δ::loxP stl1Δ::loxP fps1Δ::loxP</i>	This study
Plasmids		
pHI-U	ADH1 ^P -pHluorin, ScURA3, 2μ, Amp ^R , ori	(Maresova et al., 2010)
pVT100-U	ScURA3, 2μ, Amp ^R , ori	(Vernet, Dignard and Thomas 1987)
pSH47	ScURA3, GAL1 ^P -Cre-CYC1 ^T , CEN6/ARSH4; Amp ^R , ori	(Guldener et al., 1996)
pUG6	loxP-TEF2 ^P -kanMX-TEF2 ^T -loxP, Amp ^R , ori	(Guldener et al., 1996)
pGRU1-ScSTL1	ScURA3, NHA1 ^P -ScSTL1-GFP, 2μ, Amp ^R , ori	(Duskova manuscript in preparation)

Table 2. Oligonucleotides used in this study (5'-3').

Gene deletion	
ScSTL1-kanMX-R	GCGGCAAGGAACAAATATAAACCCCGCAA AATGCTTTCTTAAGTAAATTAGAAAATATG ATTTGTGAGTTGTGTGTAAGcataggccacta gtggatctg
ScSTL1-kanMX-F	AATTATTTTGTATACGTGTTCTAGCATACA AGTTAGAATAAATAAAAAATAGAAAAATA GAACATAGAAAGTTTAGACCTtcgtacgtg caggtcgac
ScFPS1-kanMX-R	CCGGCGGTAGTAAGCAGTATTTTTTCTAT CAGTCTATATTATTTGTTTCTTTTCTTGT CTGTTTTGcataggccactagtggatctg
ScFPS1-kanMX-F	CGCCTATTGTCCCAATAAGCGTCGGTTGTT CTTCTTTATTATTTTACCAAGTACGCTCGA GGGTACATTCTAATGCATTAAAAGACTtcgta cgctgcaggtcgac
ScHOG1-kanMX-R	GTAAGAATGAGTGGTTAGGGACATTAAAA AAACACGTTTAgcataggccactagtga
ScHOG1-kanMX-F	AAAGGAAAAACAGGGAAAACTACAATA TCGTATATAATAttcgtacgtcgaggtcgac
Diagnostic	
ScSTL1-362up-F	CCTCGCCAGGTGCAGCTATTGCGC
ScSTL1-242in-R	CGGCCCTGCACTACAGTTGCG
ScSTL1-283in-F	CCGCCGGAAGAAGTTTGGAGG
ScSTL1-383down-R	GAACATCCATGGCGGCACCTGCG
ScFPS1-235up-F	CGCAATTCAGTAGTTAAAAGCGG
ScFPS1-408in-R	GCTTGCACTCGGCGGACCG
ScFPS1-220in-F	GTCATCTATTTTCAACAACG
ScFPS1-301down-R	GGTTTGGATACTATCATTAACC
ScHOG1-294up-F	CGCGGTTATTATACGGGAGG
ScHOG1-334in-R	GCAAGAGTCTATGTAAATCT
ScHOG1-363in-F	GCCAAAGTTCGATTGGCACTT
ScHOG1-162down-R	CATGATCGAAATACGTCCAC
kanMX-R1	CTCTGGCGCATCGGGC
kanMX-F1	CATTTGATGCTCGATGA

DNA sequences complementary to the sequences of the deletion cassette are shown in lowercase letters.

was used. YNB (0.69% YNB w/o amino acids, Formedium™, UK) supplemented with 2% glucose and BSM w/o uracil was used for visualization of ScStl1-GFP in *S. cerevisiae* BY4741 *stl1Δ*. Solid media were supplemented with 2% agar.

Growth phenotypes

The growth of strains under various conditions was monitored by drop tests. Cells grown on YPD plates at 30°C for 48 h were suspended in sterile water to $A_{600} = 2$. Serial 15-fold dilutions of cell suspensions were spotted on YPD or YPM plates supplemented as indicated. Their growth was monitored for 7 days. Representative results of one of three experiments are shown.

Cell size

A CasyCell Counter (Roche) with a 60 μ m capillary was used to determine cell size. 10 μ l of cells in the exponential phase of growth in YPD, after 16 h in YP + 1M mannitol and 45 min in distilled water, were diluted in 10 ml of CasyTon® dilution buffer and subsequently analysed according to the manufacturer's instructions. The experiment was repeated three times, in each experiment three aliquots of 2×10^4 cells were analysed, and

the means \pm SD of one of the representative are shown. Intervals containing the most typical 60% of the population are shown in the box plot diagram with the mean diameter.

Fluorescence microscopy

To visualize the morphology of cells staining with Primuline was used, and for Stl1, its coding sequence was tagged with GFP sequence in pGRU1-ScSTL1 plasmid. The fluorescence signals were observed under an Olympus AX70 microscope using an U-MWB cube with a 450–480 nm excitation filter and 515 nm barrier filter. The fluorescence micrographs were taken using an Olympus DP70 digital camera.

Survival of stresses

To determine the tolerance of cells to hyper- and to hypoosmotic stresses, cells were grown to $A_{600} = 0.6$ in 50 ml of YPD. Cultures were transferred to YPD + 1M mannitol for 16 h and then to H₂O for 45 min. In each step of this procedure, the A_{600} of cells was adjusted to 1 and subsequently 50 μ l of 2000-fold and 100 μ l of 20 000-fold diluted aliquots were plated on YPD in triplicate. The colony forming units (CFU) were counted after 2 days of growth. The experiment was repeated at least three times and the means \pm SD of three independent experiments are presented.

The survival of abiotic stress (Borovikova et al., 2014) was estimated with cells grown to the stationary phase in 200 ml of YPD. Harvested cells were washed and dehydrated by convective drying at 30°C for 15–16 h until the humidity of the biomass reached approximately 9–10%. The dehydrated biomass was rehydrated in distilled water at room temperature for 10 min. Cells were exposed to distilled water or 1 M glycerol at 30°C for 3 h before dehydration stress in some experiments. Cell survival was estimated using the fluorochrome Primuline and fluorescence microscopy (Rapoport and Meysel 1985). The experiments were repeated —three to four times and the means \pm SD are presented.

Intracellular pH

Cells were transformed with pHl-U plasmids harbouring the coding sequence of pHluorin (Maresova et al., 2010), and were grown in YNB-pH medium supplemented with BSM w/o uracil to $A_{600} = 0.5$ for pH_{in} measurement. The fluorescence intensities were recorded using a SynergyHT microplate reader (BioTek Instruments) with emission filter 516/20 nm and excitation filters 400/30 and 485/20 nm. For elimination of the background fluorescence, a wild-type culture with an empty vector (pVT100-U) was grown in parallel and these background fluorescence values were subtracted from the fluorescence at each excitation wavelength (software Gen 5, BioTek Instruments). The calibration curves were generated as described previously (Orij et al., 2009) plotting the ratio of emission at both excitation wavelengths ($I_{400/485}$) against the pH of a series of citric acid/Na₂HPO₄ buffers of various pH (5.7–7.7). Each strain was measured in 20 wells within one experiment (technical replicates) and the presented data are means \pm SD of at least four independent experiments (biological replicates).

RESULTS AND DISCUSSION

In order to estimate the contribution of glycerol transporters to the cells' physiological parameters and tolerance to various stresses, we first constructed a series of single mutants lacking either the system importing (*stl1Δ*) or exporting (*fps1Δ*) glycerol

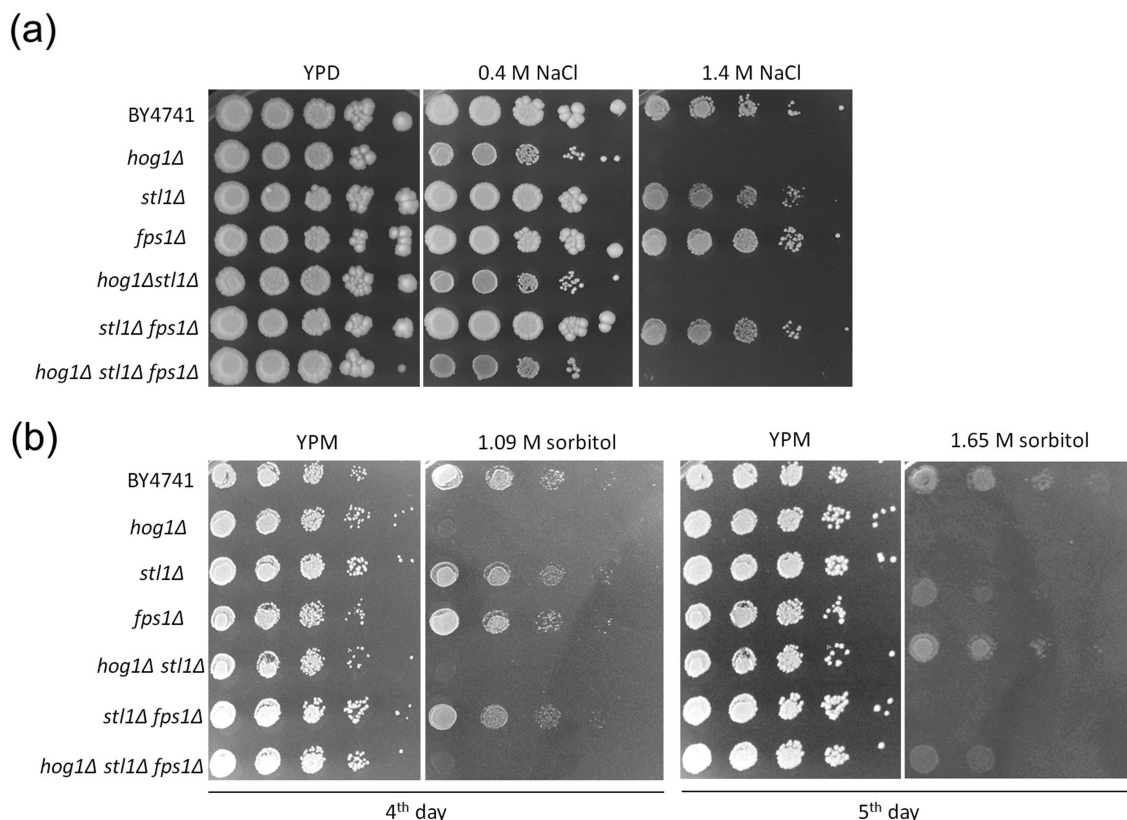


Figure 1. Growth of strains on (a) YPD agar supplemented with 0.4 and 1.4 M NaCl, recorded in fifth day of incubation at 30°C and (b) YPM agar supplemented with 1.09 and 1.65 M sorbitol, respectively, fourth and fifth day of incubation.

or lacking Hog1p kinase (*hog1Δ*), which is the crucial activator of glycerol synthesis upon stress. We then constructed a series of mutants lacking various combinations of these three genes (Table 1). The triple mutant (*hog1Δ stl1Δ fps1Δ*), which is not able to actively accumulate glycerol from the environment or quickly release its surplus when necessary or increase its synthesis upon stress, was viable under standard growth conditions (YPD); however, its growth was slightly slower than that of the wild type (cf. last drops, first and last lines, Fig. 1a, YPD panel). When we tested salt tolerance, all strains lacking the *HOG1* gene were very sensitive to the presence of NaCl (Fig. 1a). They were not able to grow if the concentration of NaCl was higher than 0.6 M (not shown). Deletion of the *FPS1* gene had no phenotype upon hyperosmotic stress, in agreement with the closure of this channel under those conditions. At high NaCl concentrations, e.g. 1.4 M, a slight inhibition of the growth of *stl1Δ* and *stl1Δ fps1Δ* strains was observed (Fig. 1a). When the cells were grown on plates supplemented with mannitol as a source of carbon (glucose represses and inactivates Stl1p), the importance of Stl1p for the tolerance of osmotic stress was clearly evident (Fig. 1b, last panel).

Cell size and morphology

As glycerol content is thought to play a role in cell size and morphology, we estimated the size of cells growing under standard conditions, under hyperosmotic conditions and in a hypoosmotic environment. Surprisingly, only the *stl1Δ* mutation resulted in slightly but significantly bigger YPD-growing cells (Fig. 2a). When we followed the size of cells transferred from YPD

to YPD + 1 M mannitol (for 16 h) and subsequently transferred to distilled water for 45 min, the wild-type, *stl1Δ*, *fps1Δ* and *stl1Δ fps1Δ* cells shrank similarly (Fig. 2b) and their morphology was also similar (Fig. 2c). On the other hand, the deletion of *HOG1* resulted in cells producing pseudohyphae upon high-mannitol stress (Fig. 2c, and similar results obtained in YPD + 0.5 M NaCl, not shown), which was also observed as an increase in the average cell size (Fig. 2b). The change in the morphology of *hog1Δ* cells upon osmotic stress is caused by a crosstalk between the HOG and filamentation/invasion pathways (Brewster and Gustin 1994).

Taken together, the results obtained suggested that the Stl1p transporter is not fully repressed and inactivated in BY4741 cells growing in YPD, and that its activity contributes to the regulation of cell volume. This is different from the results obtained with W303-derived mutants (Ferreira *et al.*, 2005) and it confirms that the construction and phenotypic testing of a new series of mutants with a different genetic background can bring significantly new results.

Survival of changes in water activity

When we estimated the survival rate of mutant strains treated first with high mannitol and then with water (cf. above and the section 'Materials and methods'), surprising results were obtained. The lack of one or the other glycerol transporter resulted in a very high decrease in the number of surviving cells (approximately a 70% decrease compared to the survival of wild-type cells), and the *stl1Δ fps1Δ* combination of mutations rendered the cells extremely sensitive with only 10%

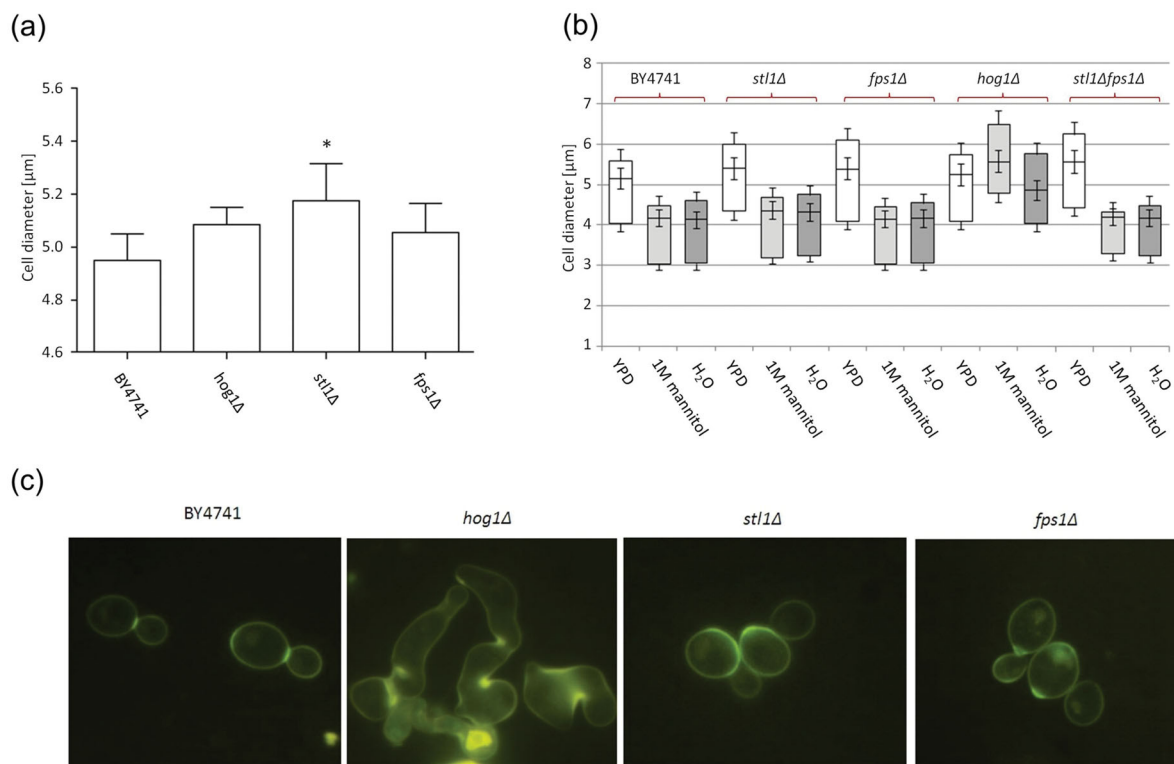


Figure 2. Cell size changes. (a) Mean cell diameters of exponentially growing cells in YPD. Differences between BY4741 and mutants were determined based on an unpaired t-test, and a significant difference was found only between BY4741 and *stl1Δ* mutants (* $P > 0.05$, $n = 3$). (b) Cell diameters estimated for cell growing exponentially in YPD (open column), after 16 h in YP + 1M mannitol (light grey column) and after subsequent 45 min in distilled water (dark grey column). The intervals containing the most typical 60% of the cell population are boxed. The mean diameter is represented by a line inside the box. The experiment was repeated at least three times and data from a representative experiment are shown. (c) Primuline-stained cells after 16 h in YP with 1M mannitol.

surviving. The deletion of *HOG1* had a much less dramatic effect, and surprisingly, the absence of Hog1p increased the very low survival of cells lacking Stl1p and/or Fps1p (Fig. 3a). To analyse the cause of the low survival of cells lacking glycerol transporters, we estimated the cell survival in each step of the treatment (Fig. 3b). The results obtained showed that the presence of both transporters contributes to the survival of hyper- and hypoosmotic stresses and suggested that the uptake and efflux of glycerol together play a role in cell adaptation to changes in external osmolarity.

When the survival of cells upon anhydrobiosis was tested, i.e. upon a decrease in water activity without adding extra solutes, it was the deletion of *STL1* that rendered the cells highly sensitive to desiccation (Fig. 3c), and in contrast to the survival of consequent hyper- and hypoosmotic stresses described above, the triple mutant lacking both transporters and the Hog1p kinase was the least tolerant to the desiccation procedure (Fig. 3c). The sensitivity to anhydrobiosis was partly abolished if the cells were treated for 180 min with 1 M glycerol prior to the desiccation (Fig. 3d). The positive effect of glycerol treatment was the highest with the triple mutant, which is unable to actively import, export or increase the production of glycerol. However, this effect was not fully glycerol-specific, a similar increase, though not so pronounced as with glycerol, was observed if the cells were treated with mild concentrations of salt or sorbitol prior to the desiccation (not shown). It was shown earlier that such hyperosmotic treatment can also switch on the synthesis of other osmoprotectants (e.g. trehalose or higher alcohols) in yeast cells and change the membrane lipid properties (Wiemken 1990; Rapoport et al., 2009; Grube et al., 2014).

Intracellular pH and Stl1p localization

The results obtained for the *stl1Δ* strain suggested that Stl1p may be at least partly expressed and functional in BY4741 cells growing on glucose. To confirm the hypothesis, two types of experiments were performed. As the Stl1's mechanism of transport is thought to be a symport of glycerol with protons (Ferreira et al., 2005), we expressed pHluorin in our mutants and measured the intracellular pH of cells during their exponential growth in YNB-pH. As shown in Fig. 4a, the deletion of *STL1* increased the intracellular pH significantly, both in the single, double and triple mutants. On the other hand, disruption of the signalling HOG pathway by deleting *HOG1* did not change the intracellular pH, which was a surprising result given the known multiple effects of *HOG1* deletion (Alepuz et al., 2001; Escote et al., 2004; Escote et al., 2011; Li et al., 2012; Brewster and Gustin 2014).

When we tagged the Stl1p with GFP, we could demonstrate that a significant portion of the Stl1 protein was localized in the plasma membrane even when the cells were growing with glucose as a source of carbon (Fig. 4b).

In summary, our results obtained with a new series of BY4741 mutants combining the lack of both the transporters, and diminished production of glycerol showed that the activity of both the importer and exporter of glycerol is necessary for a high survival of adverse conditions, and that in some cases the simultaneous disruption of the HOG signalling pathway can improve the survival of cells lacking glycerol transporters (Fig. 3a, exponentially growing cells exposed to hyper- and then hypoosmotic stresses), whereas under other conditions the deletion of

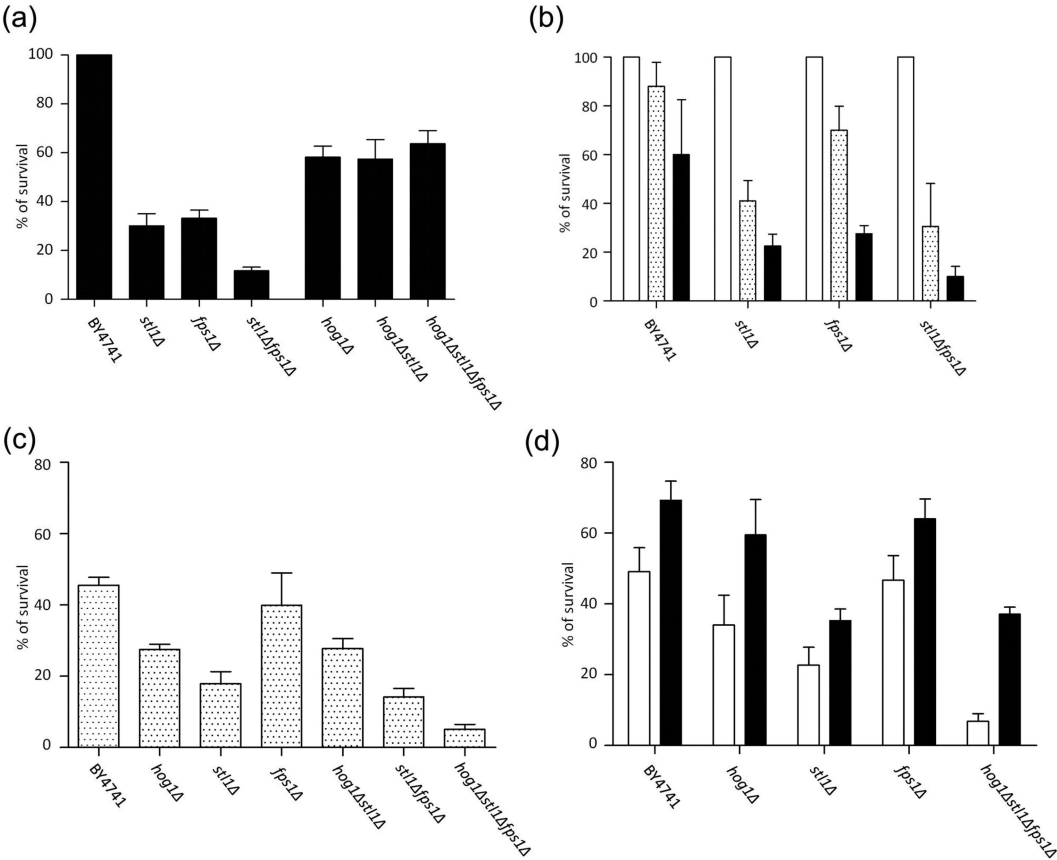


Figure 3. Survival rates of strains exposed to stresses. *Exposure to subsequent hyper/hypoosmotic conditions.* (a) CFU was estimated for cells pregrown in YPD and then cultivated for 16 h in YP + 1 M mannitol and then for 45 min in distilled water. *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 was used as a control and regarded as 100% survival. (b) Survival was estimated after each step of the treatment: after growth in YPD (open bars), 16 h in YPD + 1M mannitol (shaded bars) and 45 min in distilled water (black bars). CFU-forming cells after the growth in YPD regarded as 100% for each strain. *Exposure to desiccation.* Cells grown to stationary phase in YPD were desiccated (15–16 h, 37°C) and subsequently rehydrated (10 min, 30°C) in distilled water (c); or the cells were incubated in distilled water (open bars) or 1 M glycerol (black bars) at 30°C for 3 h prior to the desiccation procedure (d).

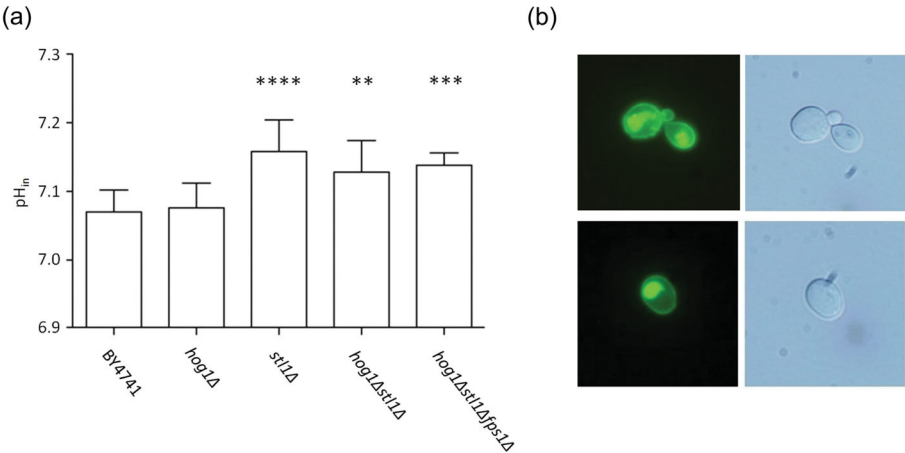


Figure 4. (a) Intracellular pH of exponentially growing cells expressing pHluorin in YNB-pH with 2% glucose. Significant differences between BY4741 and indicated mutants were determined based on an unpaired t-test (** $P > 0.01$; *** $P > 0.001$, **** $P > 0.0001$). (b) The subcellular localization of ScStl1-GFP in BY4741 stl1Δ [pGRU1-ScSTL1] grown in YNB with 2% glucose.

HOG1 hinders the survival of cells without glycerol transporters under adverse conditions (Fig. 3c and d; dehydration/rehydration survival of stationary cells). As for Stl1p glycerol importing system, our results suggest (1) that it is, besides being important for freeze tolerance (Tulha et al., 2010), important for yeast cell survival under anhydrobiotic conditions and (2) that it is not fully inactivated and repressed in BY4741 cells growing in media with glucose (and without osmotic stress), but its activity contributes to the regulation of cell volume and maintenance of intracellular pH homeostasis in growing cells.

FUNDING

This work was supported by grants from the Czech Science Foundation GA CR P503/10/0307, institutional concept RVO:67985823 (should be RVO:67985823) and Latvian Science Council grant 372/2012.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Ahmadpour D, Geijer C, Tamas MJ, et al. Yeast reveals unexpected roles and regulatory features of aquaporins and aquaglyceroporins. *Biochim Biophys Acta* 2014;**1840**:1482–91.
- Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, et al. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* 1994;**14**:4135–44.
- Alepuz PM, Jovanovic A, Reiser V, et al. Stress-induced MAP kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell* 2001;**7**:767–77.
- Ansell R, Granath K, Hohmann S, et al. The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J* 1997;**16**:2179–87.
- Borovikova D, Herynkova P, Rapoport A, et al. Potassium uptake system Trk2 is crucial for yeast cell viability during anhydrobiosis. *FEMS Microbiol Lett* 2014;**350**:28–33.
- Brewster JL, Gustin MC. Positioning of cell growth and division after osmotic stress requires a MAP kinase pathway. *Yeast* 1994;**10**:425–39.
- Brewster JL, Gustin MC. Hog1: 20 years of discovery and impact. *Sci Signal* 2014;**7**:re7.
- Clotet J, Escote X, Adrover MA, et al. Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *EMBO J* 2006;**25**:2338–46.
- Escote X, Miranda M, Rodriguez-Porrata B, et al. The stress-activated protein kinase Hog1 develops a critical role after resting state. *Mol Microbiol* 2011;**80**:423–35.
- Escote X, Zapater M, Clotet J, et al. Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat Cell Biol* 2004;**6**:997–1002.
- Ferreira C, Lucas C. Glucose repression over *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter gene STL1 is overcome by high temperature. *FEBS Lett* 2007;**581**:1923–7.
- Ferreira C, van Voorst F, Martins A, et al. A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2005;**16**:2068–76.
- Grube M, Gavare M, Rozenfelde L, et al. Anhydrobiosis in yeast: FT-IR spectroscopic studies of yeast grown under conditions of severe oxygen limitation. *Biotechnol Appl Biochem* 2014;**61**:474–9.
- Guldener U, Heck S, Fielder T, et al. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 1996;**24**:2519–24.
- Haurie V, Perrot M, Mini T, et al. The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2001;**276**:76–85.
- Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;**66**:300–72.
- Holst B, Lunde C, Lages F, et al. GUP1 and its close homologue GUP2, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 2000;**37**:108–24.
- Kinclova-Zimmermannova O, Sychrova H. Functional study of the Nha1p C-terminus: involvement in cell response to changes in external osmolarity. *Curr Genet* 2006;**49**:229–36.
- Kohlwein SD, Daum G, Schneider R, et al. Phospholipids: synthesis, sorting, subcellular traffic—the yeast approach. *Trends Cell Biol* 1996;**6**:260–6.
- Lages F, Lucas C. Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bba-Bioenergetics* 1997;**1322**:8–18.
- Li SC, Diakov TT, Rizzo JM, et al. Vacuolar H⁺-ATPase works in parallel with the HOG pathway to adapt *Saccharomyces cerevisiae* cells to osmotic stress. *Eukaryot Cell* 2012;**11**:282–91.
- Maresova L, Hoskova B, Urbankova E, et al. New applications of pHluorin-measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast* 2010;**27**:317–25.
- Mullner H, Daum G. Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim Pol* 2004;**51**:323–47.
- Neves L, Lages F, Lucas C. New insights on glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 2004;**565**:160–2.
- Oliveira R, Lages F, Silva-Graca M, et al. Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and re-definitions. *Bba-Bioenergetics* 2003;**1613**:57–71.
- Orij R, Postmus J, Ter Beek A, et al. In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiol* 2009;**155**:268–78.
- Pahlman AK, Granath K, Ansell R, et al. The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem* 2001;**276**:3555–63.
- Philips J, Herskowitz I. Osmotic balance regulates cell fusion during mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 1997;**138**:961–74.
- Posas F, Chambers JR, Heyman JA, et al. The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* 2000;**275**:17249–55.
- Proft M, Struhl K. MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* 2004;**118**:351–61.
- Rapoport AI, Khroustalyova GM, Crowe LM, et al. Anhydrobiosis in yeast: stabilization by exogenous lactose. *Mikrobiologiya* 2009;**78**:690–4.
- Rapoport AI, Meysel MN. Survival rates of yeast organisms after dehydration as determined by fluorescence microscopy. *Microbiology* 1985;**54**:53–5.
- Rep M, Krantz M, Thevelein JM, et al. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *Hot1p*

- and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* 2000;**275**:8290–300.
- Tamas MJ, Luyten K, Sutherland FC, et al. Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol Microbiol* 1999;**31**:1087–104.
- Tulha J, Faria-Oliveira F, Lucas C, et al. Programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae* is hampered by the deletion of GUP1 gene. *BMC Microbiol* 2012;**12**:80.
- Tulha J, Lima A, Lucas C, et al. *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter Stl1p is essential for cold/near-freeze and freeze stress adaptation. A simple recipe with high biotechnological potential is given. *Microb Cell Fact* 2010;**9**:82.
- Valadi A, Granath K, Gustafsson L, et al. Distinct intracellular localization of Gpd1p and Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. *J Biol Chem* 2004;**279**:39677–85.
- Vernet T, Dignard D, Thomas DY. A family of yeast expression vectors containing the phage-F1 intergenic region. *Gene* 1987;**52**:225–33.
- Westfall PJ, Patterson JC, Chen RE, et al. Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *PNAS* 2008;**105**:12212–7.
- Wiemken A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *A Van Leeuw* 1990;**58**:209–17.
- Wysocki R, Chery CC, Wawrzycka D, et al. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 2001;**40**:1391–401.

4.3 Publikace č. 3 - Two glycerol uptake systems contribute to the high osmotolerance of *Zygosaccharomyces rouxii*.

Význam glycerolového přenašeče Stl1 pro kvasinku *S. cerevisiae* byl hlouběji prostudován v publikaci č. 2. Publikace č. 3 se zaměřuje na podrobnou charakterizaci systému aktivního přenosu glycerolu do buněk osmotolerantní *Zygosaccharomyces rouxii* CBS 732^T s úkolem tento systém nejen charakterizovat, ale především odhalit jaký nese podíl na celkové osmotoleranci této nekonvenční kvasinky. I přestože *Z. rouxii* CBS 732^T nepatří mezi nejvíce osmotolerantní kvasinkové druhy, jak bylo zjištěno v publikaci č. 1, jedná se o jeden z mála nekonvenčních kmenů, pro který jsou vyvinuty nástroje genového inženýrství a nabízí se tak řada možností jeho detailního studia (Pribylova *et al.*, 2007b, Pribylova *et al.*, 2007d, Pribylova & Sychrova, 2003).

V genomu *Z. rouxii* CBS 732^T byly nalezeny dva geny homologní k charakterizovaným *ScSTL1* a *CaSTL1*. Geny byly pojmenovány *ZrSTL1* a *ZrSTL2* a pro jejich charakterizaci byly využity dva odlišné přístupy. Prvním z nich je jejich delece v kvasince *Z. rouxii* s následnou charakterizací vzniklých mutantních kmenů a současně také konstrukce plasmidů nesoucích tyto geny. V rámci studie bylo zjištěno, že produkty obou genů jsou lokalizovány v plasmatické membráně a přenášejí přes ni glycerol v symportu s protony. Jejich absence způsobí výrazné zhoršení růstu, které je dále ještě umocněno stresovými podmínkami. Na základě získaných výsledků lze říci, že plní svoji nezastupitelnou roli za normálních nestresových růstových podmínek, v průběhu vyrovnávání se s hypoosmotickým stresem a současně také významně ovlivňují vnitrobuněčné pH. Studium kinetických parametrů transportu glycerolu ukázalo, že oba přenašeče mají sice vysokou afinitu ke glycerolu, ale současně také relativně nízkou kapacitu jeho transportu. Delece genu *ZrSTL2* navíc odkryla třetí, doposud neznámý, přenašeč s nízkou afinitou a vysokou kapacitou transportu.

Druhým z přístupů, který pomohl charakterizovat transportéry glycerolu *ZrStl1/2* byla heterologní exprese v *S. cerevisiae*. V rámci studie byly konstruovány autonomní plasmidy nesoucí geny *ZrSTL1* a *ZrSTL2*, a nebo byly oba geny do genomu *S. cerevisiae* W303 *fps1Δ* integrovány. Vzhledem k odlišnosti kmenů *S. cerevisiae* W303 a BY4741 (Publikace č. 2; Petrežselyova *et al.*, 2010, Ferreira *et al.*, 2005) byly v případě exprese genů *ZrSTL* z plasmidů, použity mutantní kmeny postrádající vlastní *ScSTL1* odvozené od obou těchto genetických pozadí. I přes výraznou úroveň sekvenční identity, pouze v případě *ZrSTL1* byla

heterologní exprese úspěšná. Na základě získaných výsledků lze tedy říci, že *ZrStl1* je schopen transportovat glycerol i v buňkách *S. cerevisiae* podobně jako *ScStl1*.

V případě, že se *Z. rouxii* vyskytne v prostředí s fruktosou a současně glukosou, konzumuje nejprve fruktosu a teprve až poté glukosu, je tedy fruktofilní, na rozdíl od *S. cerevisiae*, která se chová přesně naopak. Transport glycerolu je v *S. cerevisiae* negativně ovlivňován právě glukosou (jak na úrovni exprese, tak funkce samotného proteinu). V případě fruktofilní *Z. rouxii* bylo zjištěno obdobné chování, ale s tím rozdílem, že hlavním regulátorem je zde fruktosa. Bylo však zjištěno, že i přestože *Z. rouxii* disponuje dvěma geny pro glycerolové přenašeče, pouze *ZrSTL1* je reprimován fruktosou, zatímco *ZrSTL2* plní úlohu jakéhosi „housekeepingového“ genu, je tedy jen minimálně ovlivňován růstovými podmínkami a jeho exprese je nízká a víceméně stabilní. Gen *ZrSTL1* není ovlivňován pouze fruktosou, ale jeho exprese je výrazně regulována (pozitivně) i jinými použitými zdroji uhlíku. Pravděpodobně nejvýznamnější změny v expresi genů *ZrSTL* byly zaznamenány v buňkách pěstovaných na médiu s manitolem. Společně s dalšími získanými výsledky bylo zjištěno, že manitol sehrává významnou, zatím neobjasněnou, roli v metabolismu *Z. rouxii*.

Konstrukce plasmidů určených ke komplementaci fenotypu delece genů *ZrSTL1* a *ZrSTL2* v *Z. rouxii* dále pomohla odhalit nezbytnou velikost promotorové oblasti těchto genů (250 nt stačilo v případě *ZrSTL1*, funkční exprese genu *ZrSTL2* vyžadovala až 2000 nt dlouhý promotor).

Dušková, M., C. Ferreira, C. Lucas & H. Sychrová, (2015) Two glycerol uptake systems contribute to the high osmotolerance of *Zygosaccharomyces rouxii*. *Mol Microbiol* **97**: 541-559.

Two glycerol uptake systems contribute to the high osmotolerance of *Zygosaccharomyces rouxii*

Michala Dušková,^{1,2} Célia Ferreira,³ Cândida Lucas³ and Hana Sychrová^{1*}

¹Department of Membrane Transport, Institute of Physiology The Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic.

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic.

³Centre of Molecular and Environmental Biology (CBMA), Department of Biology, University of Minho, Braga, Portugal.

Summary

The accumulation of glycerol is essential for yeast viability upon hyperosmotic stress. Here we show that the osmotolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* has two genes, *ZrSTL1* and *ZrSTL2*, encoding transporters mediating the active uptake of glycerol in symport with protons, contributing to cell osmotolerance and intracellular pH homeostasis. The growth of mutants lacking one or both transporters is affected depending on the growth medium, carbon source, strain auxotrophies, osmotic conditions and the presence of external glycerol. These transporters are localised in the plasma membrane, they transport glycerol with similar kinetic parameters and besides their expected involvement in the cell survival of hyperosmotic stress, they surprisingly both contribute to an efficient survival of hypoosmotic shock and to the maintenance of intracellular pH homeostasis under non-stressed conditions. Unlike *STL1* in *Sa. cerevisiae*, the two *Z. rouxii* *STL* genes are not repressed by glucose, but their expression and activity are down-regulated by fructose and upregulated by non-fermentable carbon sources, with *ZrSTL1* being more influenced than *ZrSTL2*. In summary, both transporters are highly important, though *Z. rouxii* CBS 732^T cells do not use external glycerol as a source of carbon.

Introduction

Tolerance to changes in environmental water activity is one of the key factors enabling microorganisms, including yeasts, to survive in nature. Water activity is the chemical potential of free water in solution. As the range of water activity may change very rapidly (rain, desiccation, etc.), microorganisms have developed sophisticated strategies to adapt and survive to these changes. Upon hypoosmotic stress, i.e. high water activity, water penetrates into the cytosol following its concentration gradient and cells have a tendency to swell. During hyperosmotic stress (low external water activity), water leaves the cells and they shrink. To prevent excessive changes in the intracellular water concentration, cells correlate the concentration of compatible solutes in the cytosol with the external water activity. The strategy for accumulating compatible solutes in osmoadaptation is relatively conserved in bacteria, archaea and eukaryota, although the solutes differ (Yancey *et al.*, 1982; Yancey, 2005; Saito and Posas, 2012). Glycerol, as a small and uncharged molecule, is the main and most frequently used compatible solute in yeast species (Brown, 1978; Edgley and Brown, 1978; Neves *et al.*, 2004). On the one hand, external glycerol may serve as a source of carbon for growth; and on the other, yeasts produce it for osmoadaptation purposes, for maintaining the redox balance (Vandijken and Scheffers, 1986; Ansell *et al.*, 1997; Larsson *et al.*, 1998), in response to temperature (Izawa *et al.*, 2004a,b) and oxidative stresses (Pahlman *et al.*, 2001), and last, but not least as a precursor of glycerolphospholipid synthesis (Hohmann, 2002; Czabany *et al.*, 2007). The ability to both produce and consume glycerol, together with its broad-scale use in cell metabolism and physiology requires a tight regulation of its synthesis, catabolism, uptake and release. Among the key factors, regulating the glycerol content in yeast cells is the mitogen-activated protein kinase HOG signalling pathway (Brewster and Gustin, 2014) and two types of transporters in the yeast plasma membrane, an active importer [Stl1; (Ferreira *et al.*, 2005)] and an efflux channel [Fps1; (Tamas *et al.*, 1999)]. Upon hyperosmotic shock, the HOG pathway is activated and it helps the cells: (i) to immediately close the transporters through which the compatible solutes [glycerol via Fps1p; (Ahmadpour *et al.*, 2014) or

Accepted 5 March, 2015. *For correspondence. E-mail sychrova@biomed.cas.cz; Tel. (+420) 241 062 556; Fax (+420) 241 062 488.

ions [potassium via Nha1p and Tok1p; (Proft and Struhl, 2004; Kinclova-Zimmermannova and Sychrova, 2006)] may be lost, (ii) to upregulate the synthesis of a glycerol-importing protein [Stl1; (Rep *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2005)] and (iii) to increase the synthesis of glycerol (Hohmann, 2002).

Osmotolerant yeast species produce, in general, less glycerol upon osmotic stress, but are able to accumulate and retain it in their cytosol more effectively than the conventional yeasts *Saccharomyces cerevisiae* or *Schizosaccharomyces pombe* (Edgley and Brown, 1978; van Zyl and Prior, 1990). The true nature of intrinsic osmotolerance is not well understood as some salt-tolerant yeast species, living at the boundaries of salt solubility, maintain similar intracellular glycerol homeostasis to *Sa. cerevisiae* (Silva-Garcia and Lucas, 2003; Silva-Graca *et al.*, 2003). An effective active reuptake of synthesised and lost glycerol is believed to be one of the factors enabling some yeast species to survive with a relatively low energy cost for glycerol synthesis in an environment with a high osmotic pressure. This hypothesis was confirmed by a large study measuring the active uptake and accumulation of glycerol in more than 40 yeast species (Lages *et al.*, 1999) showing the existence of efficient transport systems mediating the uptake of glycerol in symport with sodium cations or protons in osmotolerant yeast species.

The existence of an active glycerol uptake system in *Sa. cerevisiae* had been known from kinetic studies (Lages and Lucas, 1997; Lages *et al.*, 1999) for many years, but it was only 10 years ago that the gene and corresponding protein were identified and their function confirmed experimentally (Ferreira *et al.*, 2005). *ScStl1p* is a glucose-regulated glycerol/H⁺ symporter whose structure resembles the structure of hexose transporters (Nelissen *et al.*, 1997). In the presence of glucose, the *ScSTL1* gene is repressed and the already existing molecules of the transporter are inactivated and after internalisation degraded in vacuoles (Ferreira *et al.*, 2005). On the other hand, the expression of *ScSTL1* is strongly induced by non-fermentable carbon sources and upon entry to the stationary phase of growth (Lages and Lucas, 1997; Rep *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2005; Roberts and Hudson, 2006). Moreover, hyperosmotic conditions and high temperature induce the synthesis of this symporter as well (Rep *et al.*, 2000; Ferreira and Lucas, 2007).

Although homologues of *ScSTL1* gene apparently exist in the genomes of almost all yeast species, Stl1, proteins have only been fully characterised in *Sa. cerevisiae* (Ferreira *et al.*, 2005) and *Candida albicans* (Kayingo *et al.*, 2009). In *C. albicans*, two *STL* genes were identified and cloned, and their products were characterised together with corresponding deletion mutants. Unlike *ScSTL1*, *CaSTL1* and its product are not affected by

glucose. The second *C. albicans* gene, *CaSTL2*, does not encode a glycerol transporter, although there is some evidence that it is involved in glycerol homeostasis (Kayingo *et al.*, 2009). The presence of active glycerol uptake systems was, based on kinetics measurements, also confirmed in other yeast species (Lages *et al.*, 1999) and biochemically characterised in *Debaryomyces hansenii* (Lucas *et al.*, 1990), *Pichia sorbitophila* (Lages and Lucas, 1994; 1995) and *Zygosaccharomyces rouxii* (van Zyl *et al.*, 1990). On the other hand, an active glycerol uptake was neither observed in the fission yeast *Sc. pombe* (Lages *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 2007) nor were *STL*-like coding sequences identified in the genomes of *Sc. pombe* and the opportunistic pathogen *Candida glabrata* (Palma *et al.*, 2007). A detailed characterisation of glycerol transporters in non-conventional yeasts is hampered due to the lack of tools for genetic manipulation (mainly gene deletion). Thus, the only possibility is heterologous expression in *Sa. cerevisiae*, which was used e.g. for *STL* genes from *D. hansenii* and *Pachysolen tannophilus* (Liu *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014).

Zygosaccharomyces rouxii is a hemiascomycetous yeast closely related to the model yeast *Sa. cerevisiae*. In contrast to glucophilic *Sa. cerevisiae*, *Z. rouxii* consumes fructose faster than glucose, i.e. it is fructophilic (Emmerich and Radler, 1983; Leandro *et al.*, 2014). It is notoriously known for its ability to spoil many food products with high concentrations of sugar such as fruit juices, syrups, dressings, ketchup and sweet sauces. The unusual physiological characteristics of this yeast, including resistance to weak acids, high temperature and an extreme osmotolerance are largely responsible for its ability to cause this spoilage (Fleet, 1992; Martorell *et al.*, 2007). On the other hand, the same physiological characteristics underlie its broad use in the food industry, e.g. in the production of soy sauce, Miso paste or balsamic vinegar (Onishi, 1963; Solieri *et al.*, 2006; Dakal *et al.*, 2014). Its extreme osmotolerance allows *Z. rouxii* to grow in an environment with high concentrations of sugar and/or salts, which normally restricts the growth of most other yeast species.

As for glycerol metabolism and transport in *Z. rouxii*, as in *Sa. cerevisiae*, *Z. rouxii* employs two different mechanisms for glycerol transport and possesses the members of the HOG pathway (Iwaki *et al.*, 1999). For glycerol efflux, ZrFps1p is a low-affinity transporter releasing glycerol from cells by facilitated diffusion. It conserves the structural features and regulatory mechanisms of ScFps1p, i.e. hyperosmotic conditions cause closing, and hypoosmotic stress induces opening of this channel (Tang *et al.*, 2005). The active uptake of glycerol was studied intensively in this species, and its accumulation in cells was believed to be driven by a symport with Na⁺ (van Zyl *et al.*, 1990; Lages *et al.*, 1999). Despite all similarities with *Sa. cerevisiae*, there are several pieces of strong evidence for a different

Table 1. List of strains.

Strain	Genotype	Source/reference
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>		
CBS 732 ^T	Wild type	CBS collection
UL4	CBS 732 ^T <i>ura3</i>	Pribylova and Sychrova (2003)
MS1	UL4 <i>stl1Δ::loxP</i>	This study
MS2	UL4 <i>stl2Δ::loxP</i>	This study
MS12	UL4 <i>stl2Δ::loxP stl1Δ::kanMX</i>	This study
DLA2	<i>ura3 leu2Δ::loxP ade2Δ::loxP</i>	Pribylova <i>et al.</i> (2007b)
DLAM1	DLA2 <i>stl1Δ::loxP</i>	This study
DLAM2	DLA2 <i>stl2Δ::loxP</i>	This study
DLAM12	DLA2 <i>stl1Δ::loxP stl2Δ::kanMX</i>	This study
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>fps1Δ</i>	W303-1A <i>fps1Δ::LEU2</i>	M. Duskova, unpubl. obs.
<i>fps1Δ stl1Δ</i>	W303-1A <i>fps1Δ::LEU2 stl1Δ::kanMX</i>	M. Duskova, unpubl. obs.
<i>fps1Δ stl1Δ::ZrSTL1</i>	W303-1A <i>fps1Δ::LEU2 stl1Δ::ZrSTL1-TPS1^T-kanMX</i>	M. Duskova, unpubl. obs.
<i>fps1Δ stl1Δ::ZrSTL2</i>	W303-1A <i>fps1Δ::LEU2 stl1Δ::ZrSTL2-TPS1^T-kanMX</i>	M. Duskova, unpubl. obs.
<i>fps1Δ stl1Δ::ScSTL1</i>	W303-1A <i>fps1Δ::LEU2 stl1Δ::ScSTL1-TPS1^T-kanMX</i>	M. Duskova, unpubl. obs.
<i>hog1Δ stl1Δ</i>	W303-1A <i>hog1Δ::LEU2 stl1Δ::kanMX</i>	M. Duskova, unpubl. obs.
BW31a	W303-1A <i>nha1::LEU2 ena1Δ::HIS3::ena4Δ</i>	Kinclova-Zimmermannova <i>et al.</i> (2005)
BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF collection
<i>stl1Δ</i>	BY4741 <i>stl1Δ::loxP</i>	Duskova <i>et al.</i> (2015)
AQ	<i>ura3</i>	A. Querol, Valencia

^T, terminator.

regulation of glycerol metabolism and transport in *Z. rouxii* (van Zyl *et al.*, 1991; Iwaki *et al.*, 2001; Pribylova *et al.*, 2007a).

Taking advantage of the sequenced genome (Sherman *et al.*, 2009) and the existence of tools for the genetic manipulation of *Z. rouxii* (Pribylova and Sychrova, 2003; Pribylova *et al.*, 2007b,c), we characterised two *Z. rouxii* glycerol-importing systems (ZrStl1 and ZrStl2) in this study. To characterise their transport activity and physiological function, we constructed single- and double-deletion mutants of *Z. rouxii*, described their growth and stress-tolerance phenotypes, measured the uptake of glycerol and estimated their expression under various conditions. To compare the Stl proteins' transport activity, we also expressed the two *Z. rouxii* genes in *Sa. cerevisiae* cells. Our results showed that both genes encode functional glycerol uptake systems, which differ in their physiological role and regulation of expression. Taken together, *Z. rouxii* Stl transporters fulfil a very important role in the physiology of this osmotolerant yeast species, and contribute to its 'spoiling' nature.

Results

Z. rouxii possesses two highly similar homologues of the ScSTL1 gene

Although the existence of an efficient active uptake of glycerol in *Z. rouxii* as well as in some other osmotolerant yeast species was suggested in the past (van Zyl *et al.*, 1990; Lages and Lucas, 1995; Lages *et al.*, 1999), only two

systems have been characterised so far [Stl1 transporters from *Sa. cerevisiae* and *C. albicans*; (Ferreira *et al.*, 2005; Kayingo *et al.*, 2009)]. We found two open-reading frames similar to the *ScSTL1* and *CaSTL1* genes in the genome of *Z. rouxii* CBS 732^T. The ZYRO0E01210g ORF (Gene ID: 8204531) and the ZYRO0E01188g ORF (Gene ID: 8204530) are localised in tandem on the Zyro0E chromosome and we named them *ZrSTL1* and *ZrSTL2*, respectively. At the protein level, both *Z. rouxii* Stl proteins share 67% identity (70% if sequences without the hydrophilic termini are compared), and their identity with *ScStl1p* and *CaStl1p* ranges from 57% to 63%. They probably contain 12 transmembrane segments as well as five motifs conserved in the family of yeast sugar transporters [Fig. S1 and Leandro *et al.* (2009)]. It is worth noting that the hydrophilic N-terminus of ZrStl2p is 87 amino acids longer than that of ZrStl1p (Fig. S1).

Only ZrStl1p is fully functional in Sa. cerevisiae and transports glycerol similarly to ScStl1p

To characterise and compare the properties of the products of *ZrSTL1* and *ZrSTL2* genes, we first used heterologous expression in *Sa. cerevisiae*. The *Sa. cerevisiae* W303-derived strains used lacked their own *STL1*, *FPS1* and *HOG1* genes in various combinations (Table 1), and thus were unable to import and/or export glycerol, increase its production upon hyperosmotic stress and consequently were more osmosensitive than the parental strain. Both *ZrSTL* genes were either cloned in multicopy YEp352-based plasmids (Table S1) behind a weak and constitutive

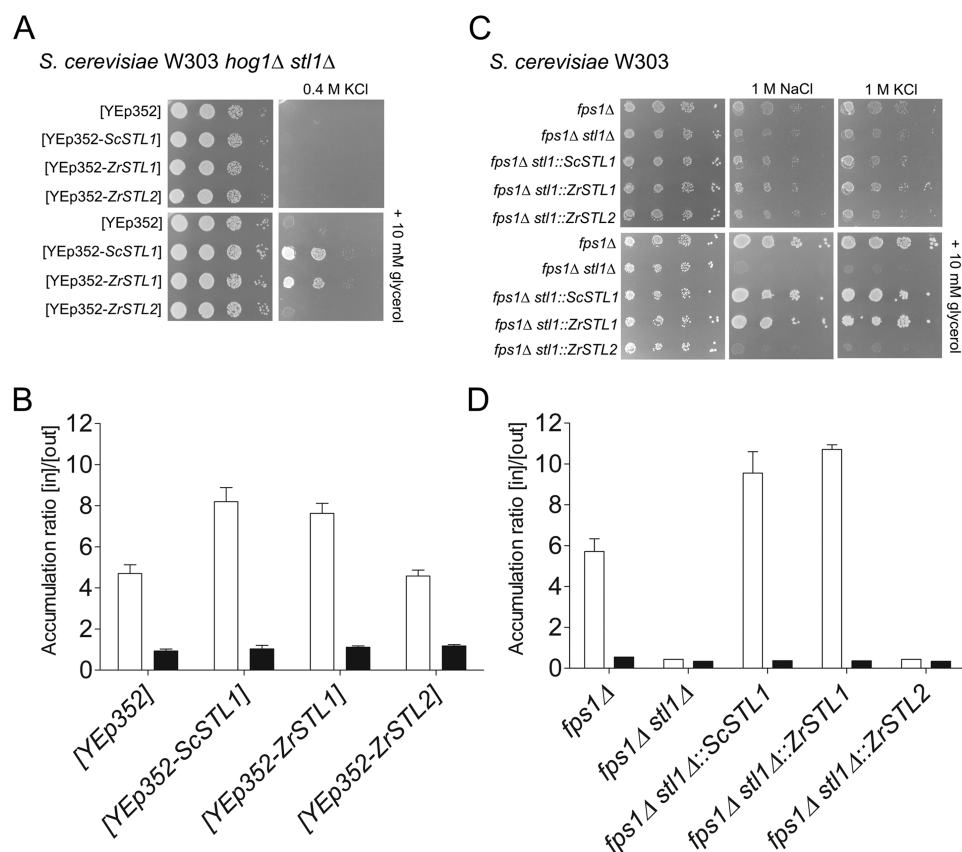


Fig. 1. Expression of *ZrSTL1* and *ZrSTL2* in *Saccharomyces cerevisiae*.

A. Growth phenotypes of *Sa. cerevisiae* W303 *hog1Δ stl1Δ* transformed with empty vector YEp352 or its derivatives with the three *STL* genes YEp352-*ScSTL1*, YEp352-*ZrSTL1*, YEp352-*ZrSTL2*. Cells were grown on solid YNB media (2% mannitol, BSM without uracil) with KCl and glycerol as indicated.

B. Accumulation ratios of ^{14}C -glycerol in *Sa. cerevisiae* W303 *hog1Δ stl1Δ* (transformed with plasmids as in A) grown in YEPG (open bars) or YNB with 2% glucose (black bars). The plot shows the accumulation ratios after 45 min. Each bar represents a mean \pm SD of three biological replicates.

C. Growth phenotypes of *Sa. cerevisiae* W303 derivatives *fps1Δ*, *fps1Δ stl1Δ*, *fps1Δ stl1::ScSTL1*, *fps1Δ stl1::ZrSTL1* and *fps1Δ stl1::ZrSTL2*. Cells were grown on solid YNB media (2% mannitol, BSM) supplemented with salts and glycerol as indicated.

D. Accumulation ratios of ^{14}C -glycerol in *Sa. cerevisiae* W303 derivatives *fps1Δ*, *fps1Δ stl1Δ*, *fps1Δ stl1::ScSTL1*, *fps1Δ stl1::ZrSTL1* and *fps1Δ stl1::ZrSTL2* grown in YEPG (open bars) or YPD (black bars). The plot shows the accumulation ratios after 45 min. Each bar represents a mean \pm SD of three biological replicates.

ScNHA1 promoter (Banuelos *et al.*, 1998) or integrated into the *ScSTL1* locus. As positive controls, similar episomal and integrative constructs with *ScSTL1* were used (Table 1 and Table S1). The transformation of strains with the empty YEp352 and a *Sa. cerevisiae* mutant lacking its own *STL1* gene served as negative controls, respectively. The ability of the constructed strains expressing *ZrSTL* genes to grow under conditions differing in their available carbon source (fermentative or respirative) and solutes (KCl, NaCl, sorbitol) used for osmotic stress was determined in a series of drop tests. The results obtained with cells transformed with multicopy plasmids showed that only the expression of *ZrStl1* or *ScStl1* complemented the high osmosensitivity of a *Sa. cerevisiae* *hog1Δ stl1Δ* strain, and enabled it to grow in the presence of salts. The full

complementation occurred if the growth medium was supplemented with a low concentration of glycerol, as shown in Fig. 1A for cells growing on 2% mannitol and 0.4 M KCl. Similar results for cells expressing *ZrSTL1* or *ScSTL1*, i.e. improved growth in the presence of low concentrations of glycerol, were obtained when media with glucose and NaCl were used (not shown). The expression of *ZrSTL2* from a multicopy plasmid did not show a clear phenotype under any of the tested conditions. To confirm the ability of *ZrStl1p* to transport glycerol, we first measured the accumulation of radiolabelled glycerol in cells harbouring the *STL* genes on multicopy plasmids and grown either with fermentative or respirative carbon sources. As shown in Fig. 1B, the accumulation of glycerol was significantly higher in cells expressing *ZrStl1p* and *ScStl1p* than in cells transformed

with an empty plasmid or with a plasmid harbouring the *ZrSTL2* gene. This difference was only observed if the cells were grown in a media with a non-fermentable source of carbon (Fig. 1B, white bars). When the cells were grown in the presence of glucose, no accumulation was observed (Fig. 1B, black bars) which suggested that *ZrStl1p* might be inactivated by glucose, like *ScStl1p*. Similar results were obtained when cells with *Z. rouxii* genes integrated into the *ScSTL1* locus were compared (Fig. 1C and D). The presence of both *STL1* genes (but not that of *ZrSTL2*) improved, in the presence of a low amount of added glycerol, the tolerance of cells to salts and these cells accumulated a much higher amount of external glycerol. Surprisingly, the reintegration of *ScSTL1* to its original locus resulted in cells with a higher accumulation of glycerol than that observed for cells with the original *ScSTL1* locus (cf. Fig. 1D *fps1Δ* vs. *fps1Δ stl1::ScSTL1*). This result was most likely due to the use of the *ScTPS1* terminator (Yamanishi *et al.*, 2011) in the integrative plasmid with *ScSTL1* (M. Duskova, unpublished).

Altogether, the expression of *Z. rouxii STL* genes in *Sa. cerevisiae* revealed that *ZrStl1p* is a glycerol transporter with similar properties (putative inactivation by glucose in *Sa. cerevisiae* cells) to *ScStl1p*, and that *ZrStl2p* is either not properly expressed in *Sa. cerevisiae* or does not function as a glycerol transporter. Green Fluorescent Protein (GFP) tagging of *ZrStl1* and *ZrStl2* coding sequences revealed that *ZrStl1* is properly localised in the *Sa. cerevisiae* plasma membrane, whereas no fluorescence signal was observed in cells transformed with a plasmid encoding *ZrStl2*-GFP protein (not shown).

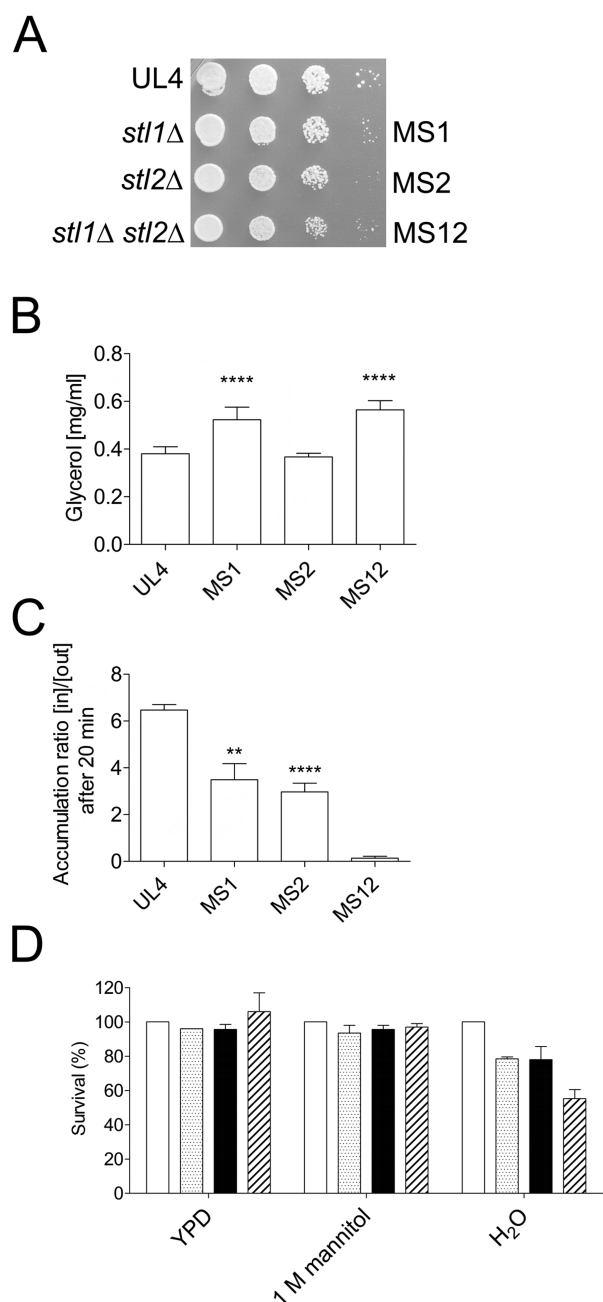
Z. rouxii mutants lacking STL genes are more sensitive to changes in external osmolarity, produce more and accumulate less glycerol

To construct *Z. rouxii* mutants lacking *STL* genes we used the UL4 (*ura3*) and DLA2 (*ade2 leu2 ura3*) strains, derived from CBS 732^T (Table 1). When we compared the growth of the three strains and their salt tolerance, it was evident that the auxotrophic mutations were not innocuous. They produced a slower growth under standard conditions [YNB supplemented with 2% glucose and Brent Supplement Mix (BSM)] and an increased sensitivity to salt stress. The multiple auxotrophies had a more pronounced effect than the single *ura3* mutation (Fig. S2A). We constructed single- and double-deletion mutants, lacking *STL1* and/or *STL2* genes, in both the UL4 and DLA2 backgrounds. When the growth of the resulting *Z. rouxii* single (*stl1Δ* or *stl2Δ*) and double (*stl1Δ stl2Δ*) mutants was compared under standard non-stress conditions (YNB supplemented with 2% glucose and BSM), it was evident that the deletion of *STL* genes slightly inhibited the growth of UL4-derived mutants (Fig. 2A, left panel, last drops), and the deletion of

STL1 severely affected the growth of DLA2-derived mutants (Fig. S2B, right panel). This phenotype was visible on YNB medium and not on rich YPD (Fig. S2B, left panel). These results suggested that the *Z. rouxii* Stl transporters, mainly *Stl1p*, are not only necessary for growth under salt stress as predicted, but also in its absence, under standard conditions, which suggests glycerol might be important for *Z. rouxii* fitness on YNB with glucose. When we compared the osmotolerance of the mutants on plates containing higher concentrations of salts, it was evident, on both YNB and YPD media, that it was mainly the lack of *STL1* that rendered the *Z. rouxii* cells more sensitive to salts, and that the deletion of both *STL* genes resulted in a low salt tolerance. An example of the results obtained with DLA2-derived strains growing on YPD medium in the presence of 2.5 M KCl is shown in Fig. S2B, middle panel; similar results were obtained with NaCl or sorbitol (not shown). As the DLA2 growth was compromised under almost all conditions tested, only UL4 and its mutants were used for the rest of experiments.

The assumption of Stl function under non-stressed conditions was confirmed in an experiment where we estimated the amount of glycerol produced by UL4 and derived mutants growing under non-stressed conditions (YPD medium; $A_{600} = 1$). Figure 2B shows that the MS1 and MS12 mutants (lacking *STL1*) produced significantly more glycerol than UL4 and MS2. We also measured the accumulation of glycerol in UL4 and derived mutants and we obtained several interesting results. As we supposed, based on our experiments with the expression of *ZrSTL* genes in *Sa. cerevisiae*, the deletion of *ZrSTL1* resulted in a diminished ability to accumulate external glycerol (Fig. 2C, UL4 vs. MS1). However, the mutant with deleted *ZrSTL2* also accumulated significantly less glycerol than the parental strain (Fig. 2C UL4 vs. MS2), and the double MS12 mutant was unable to accumulate glycerol inside its cells. This was the first indication that *ZrStl2p* is also a glycerol transporter. It is worth noting that these results obtained with cells grown in YPD suggested that, unlike in *Sa. cerevisiae*, the Stl transporters were neither repressed nor inactivated by glucose in *Z. rouxii* cells.

When testing the tolerance of strains lacking the *STL* genes to a hyperosmotic stress, we also tested their ability to survive hypoosmotic shock. Testing the ability to survive a long hyperosmotic [YP + 1 M (18%) mannitol, 16 h] stress followed by a short hypoosmotic shock (H_2O , 45 min), we saw a surprising phenotype. Deletion of the *STL* genes did not change the ability of cells to survive a mild hyperosmotic stress, but it significantly affected the number of cells surviving the hypoosmotic shock (Fig. 2D). The double mutant had the most difficulty surviving a hypoosmotic stress and this phenotype was cumulative in terms of the survival of single and double mutants, respectively (Fig. 2D). Similar results were obtained when



YPD + 1M KCl instead of YP + 1 M mannitol was used (data not shown). In summary, both Stl transporters contributed to the ability to survive hypoosmotic stress.

Z. rouxii strains lacking STL genes are highly osmosensitive

A high accumulation of glycerol was usually observed for cells incubated in the presence of high concentrations of NaCl (van Zyl *et al.*, 1990; Lages *et al.*, 1999). Thus, considering the Stl proteins as glycerol uptake systems,

Fig. 2. Growth phenotypes, accumulation and production of glycerol, and stress tolerance of *Zygosaccharomyces rouxii* UL4 and *stl* mutants (MS1, $stl1\Delta$; MS2, $stl2\Delta$; MS12, $stl1\Delta stl2\Delta$). A. Growth on solid YNB media supplemented with 2% glucose and BSM. B. Total concentration of glycerol produced by cell cultures grown up to $A_{600} = 1$ in YPD. The error bars represent the means of the results of three biological replicates assayed in triplicate \pm SD. ****, $P < 0.0001$ (two-tailed Student's *t*-test versus *Z. rouxii* UL4). C. Accumulation ratios of ^{14}C -glycerol in cells grown in YPD. The bars represent the accumulation ratio after 20 min. Presented results are the means \pm SD of three biological replicates. **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$ (two-tailed Student's *t*-test versus UL4). D. Survival of combination of hyperosmotic (16 h in YP + 1 M mannitol) and subsequent hypoosmotic (45 min in distilled water) conditions evaluated in a CFU assay. The CFU was estimated after each step of the experiment. CFU of UL4 (open bars) represent 100% of survivors. MS1, $stl1\Delta$, shaded bars; MS2, $stl2\Delta$, black bars; MS12, $stl1\Delta stl2\Delta$, hatched bars.

deletion of the *STL* genes should mainly affect the growth of *Z. rouxii* cells in the presence of salts. This was tested in a series of drop tests on plates supplemented with various solutes to elucidate whether the mutant phenotype was salt-specific. Besides relatively toxic NaCl, high concentrations of non-toxic KCl or of a non-salt solute (sorbitol or mannitol) were tested. The results from our previous work had shown that a slightly higher osmolarity (approx. 0.3–0.5 M of NaCl) supported the growth of *Z. rouxii* CBS 732^T on YNB medium (Bubnova *et al.*, 2014). Here we observed a similar phenotype of improved growth on YNB plates supplemented with 0.6 M KCl, and not only for the UL4 parental strain, but surprisingly for the three mutants as well (Fig. 3B, left and middle panels). A higher osmotic pressure, e.g. 1.5 M sorbitol (but also 1 M KCl, not shown), only significantly affected the growth of the MS12 double mutant (Fig. 3A and B, right panels). These results suggested that the ability of *Z. rouxii* to grow better in the presence of mild salt concentrations does not depend on the presence of *STL* genes, and simultaneously, that one *STL* gene is enough to ensure *Z. rouxii* growth under a strong hyperosmotic stress caused by non-charged solutes like sorbitol.

We also tested the influence of various solutes (simultaneously carbon sources and osmotic stress inducers, e.g. mannitol, sorbitol, maltose, sucrose or galactose) on the osmotolerance of UL4 and the derived mutants (typical results are shown in Fig. 3C). When high concentrations of sugars or polyols were used (e.g. Fig. 3C, 1 M mannitol or 1 M galactose), the growth of all tested strains was inhibited when no glycerol was added to the medium. Upon the addition of only 10 mM glycerol, the UL4 strains and the two mutants possessing one of the two Stl proteins were able to grow. The growth of the double mutant lacking both *STL* genes was not restored by the presence of glycerol (Fig. 3C, two panels on the right). This result confirmed the role of both Stl proteins in the general osmotolerance (and not only the salt tolerance) of

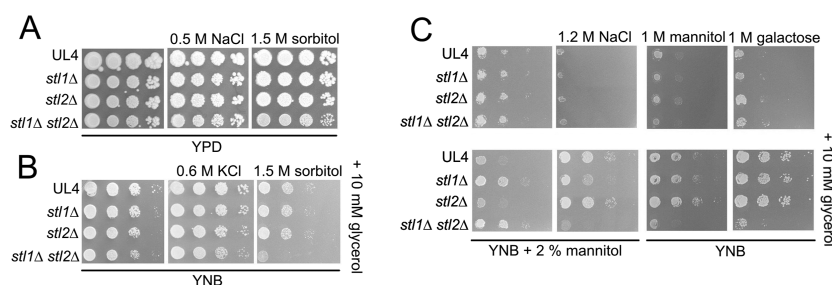


Fig. 3. Osmotolerance of *Zygosaccharomyces rouxii* UL4 and its *stl* derivatives (MS1, *stl1*Δ; MS2, *stl2*Δ; MS12, *stl1*Δ *stl2*Δ).

A. Growth phenotypes on solid YPD media supplemented with salt or sorbitol as indicated.

B. Growth phenotypes on YNB supplemented with 2% glucose and salt or sorbitol as indicated.

C. Effect of glycerol addition on osmotic stress tolerance. Growth phenotypes on YNB supplemented with mannitol or galactose as carbon sources, salt and glycerol as indicated.

Z. rouxii cells. When 2% mannitol was used as a carbon source, both expected and surprising results were obtained (Fig. 3C, two left panels). As we expected, the presence of the *ZrSTL1* gene (UL4 and MS2 strains) significantly improved the growth phenotypes in the presence of a high salt concentration and 10 mM glycerol. This result indicated that *ZrStl1* probably plays a more important role in glycerol uptake than the *ZrSTL2* gene when cells use mannitol as a source of carbon. Simultaneously, a very interesting and unexpected phenotype was observed on YNB medium with 2% mannitol as a source of carbon and 10 mM glycerol, i.e. with no hyperosmotic stress (Fig. 3C, left bottom panel). Cells lacking *ZrSTL1* (MS1 and MS12) grew better than cells with a functional *Stl1* glycerol transporter. This phenotype suggested that the uptake of glycerol via *Stl1*p when *Z. rouxii* cells grew on mannitol and without an osmotic stress was disadvantageous, and it might be related to the catabolism of mannitol and its use as a source of carbon. To elucidate whether this phenotype was specific for *Z. rouxii*, we compared the growth of *Sa. cerevisiae* BY4741 and its *stl1*Δ derivative on media supplemented with mannitol. As was observed with *Z. rouxii*, the growth of *Sa. cerevisiae* with the *stl1*Δ mutation on plates with 2% mannitol and 10 mM of glycerol was better than the growth of the corresponding wild type (data not shown).

ZrStl1p and *ZrStl2p* are plasma-membrane glycerol transporters

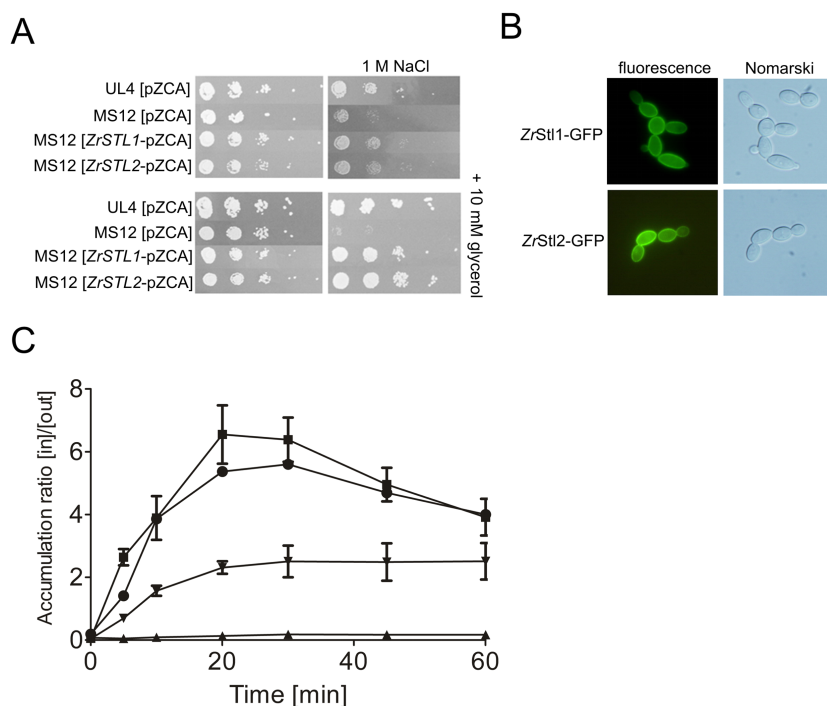
The heterologous expression of both genes in *Sa. cerevisiae* indicated that only *ZrSTL1* was a functional glycerol transporter. On the other hand, the characterisation of *Z. rouxii* mutants suggested that *ZrStl2p* was involved in glycerol transport and/or metabolism as well. To solve this discrepancy, we constructed a series of plasmids for the expression of *ZrSTL* genes (behind their own promoters) in the *Z. rouxii* MS12 mutant and for tagging their products

with GFP (Table S1). The growth of *Z. rouxii* MS12 mutants transformed with either an empty centromeric vector (pZCA) or with plasmids carrying the *ZrSTL1* and *ZrSTL2* genes was compared with the growth of UL4 harbouring the empty pZCA. Figure 4A shows that the presence of either *ZrStl1p* or *ZrStl2p* in MS12 cells complemented the phenotype of a higher sensitivity to NaCl. This complemented phenotype was much stronger when 10 mM of glycerol was added to the growth medium. Similar results were obtained with plasmids, where the GFP coding sequence was attached to the 3' ends of *Stl*-coding sequences (not shown). The GFP tagging enabled the visualisation of both *Stl* proteins. As shown in Fig. 4B, both *Stl1p* and *Stl2p* were localised to the periphery of the *Z. rouxii* cells, confirming the role of both proteins as plasma-membrane transporters. The signal was observed in cells growing in YNB supplemented with glucose. This suggested again, that in *Z. rouxii* cells, the two *STL* genes and their products are neither repressed nor inactivated by glucose.

As we saw that the double MS12 mutant lost the ability to accumulate glycerol (Fig. 2C), we tested whether the reintroduction of deleted genes on plasmids would restore the ability to accumulate glycerol. Figure 4C shows that the reintroduction of both *STL* genes in centromeric plasmids restored the ability of the *Z. rouxii* MS12 strain (*stl1*Δ *stl2*Δ) to accumulate ¹⁴C-glycerol. The accumulation of glycerol in MS12 cells expressing *Stl2p* was almost the same as in the UL4 (*STL1 STL2*) strain, and the presence of *Stl1p* resulted in a lower accumulation, but still significantly higher than in MS12 cells transformed with an empty vector (Fig. 4C).

Stl transporters contribute to *Z. rouxii* intracellular pH homeostasis

Intracellular pH is one of the most controlled parameters of cell physiology, controlling almost all processes occur-

**Fig. 4.** Complementation of *stl* deletions.

A. Growth phenotypes of *Zygosaccharomyces rouxii* UL4 and MS12 transformed with centromeric empty vectors (pZCA) or vectors carrying *ZrSTL* genes (*ZrSTL1*-pZCA, *ZrSTL2*-pZCA) on YNB media with 2% mannitol and salt or glycerol added as indicated.

B. Localisation of *ZrStl1*-GFP and *ZrStl2*-GFP proteins expressed in *Z. rouxii* MS12 (*stl1Δ stl2Δ*) exponentially growing in minimal YNB supplemented with 2% glucose.

C. Accumulation of ^{14}C -glycerol in UL4 [pZCA] (●), MS12 [pZCA] (▲), MS12 [*ZrSTL1*-pZCA] (▼), and MS12 [*ZrSTL2*-pZCA] (■) growing in YNB supplemented with 2% glucose. Each point represents the mean \pm SD of three biological replicates.

ring in cells, including the uptake of many different nutrients. Glycerol was originally suggested to be taken up in symport with Na^+ in *Z. rouxii* cells (van Zyl *et al.*, 1990; Lages *et al.*, 1999). However, we observed clear phenotypes of the deletion of *STL* genes in conditions where the concentration of sodium cations was negligible (e.g. media with high concentrations of sorbitol or mannitol). Thus, we assumed that the uptake of glycerol via *Stl* proteins might be driven by the proton gradient across the plasma membrane; i.e. the transport mechanism being a symport of glycerol with protons, similarly as in *Sa. cerevisiae* and *C. albicans*. To test this possibility, we first expressed pHluorin, a pH-sensitive variant of GFP (Miesenbock *et al.*, 1998) in *Z. rouxii* cells and estimated the intracellular pH under various conditions (Fig. 5). First, we measured the intracellular pH in cells from the mid-exponential phase of growth in YNB-pH with 2% glucose, and we found that the pH of all three mutants lacking one or both *STL* genes was significantly higher than the pH of control UL4 cells (Fig. 5A). This result suggested that the higher intracellular pH was due to a diminished influx of protons via *Stl* transporters. The glycerol/ H^+ symport mechanism was confirmed by monitoring the changes in extracellular pH of an unbuffered cell suspension upon the addition of a glycerol pulse (Fig. 5D). A fast alkalisation of the external medium, i.e. the H^+ influx associated with glycerol uptake, was only observed when the UL4 (*STL1 STL2*) cells were used.

Then the effect of changing the growth medium on intracellular pH was monitored. Cells from the mid-exponential phase of growth in YNB-pH with 2% glucose were transferred to fresh YNB-pH medium supplemented with either 2% mannitol (Fig. 5B) or 2% glucose (Fig. 5C). When cells were transferred to YNB-pH medium supplemented with 2% mannitol as a source of carbon (Fig. 5B), the intracellular pH slightly dropped in all strains. In addition, on mannitol, as in the drop tests, the effect of *STL1* deletion on the intracellular pH was more significant than that of *STL2* deletion. This result again confirmed the prevailing role of *Stl1p* when cells grew on mannitol as a source of carbon. On the other hand, when the cells were transferred to the same fresh medium with 2% glucose, the intracellular pH rose in all strains (Fig. 5C). The difference between the wild type and mutants also increased (from approx. 0.1 to 0.2 pH units, cf. Fig. 5A and C). The increase in intracellular pH observed upon transferring the cells to fresh YNB medium supplemented with 2% glucose (Fig. 5C) suggested that *Z. rouxii* cells responded to the fresh media (and certain carbon sources) by increasing the activity of Pma1 H^+ -ATPase, similarly to *Sa. cerevisiae* (Orij *et al.*, 2009). Proton efflux through the ScPma1 ATPase is only activated by sugars metabolised in glycolysis (glucose, fructose and mannose) and not by e.g. galactose (Serrano, 1983). Figure 6A shows that *Z. rouxii* Pma1p behaved similarly to *Sa. cerevisiae* Pma1p and was only activated by fresh glucose and fructose. Neither *Z. rouxii*

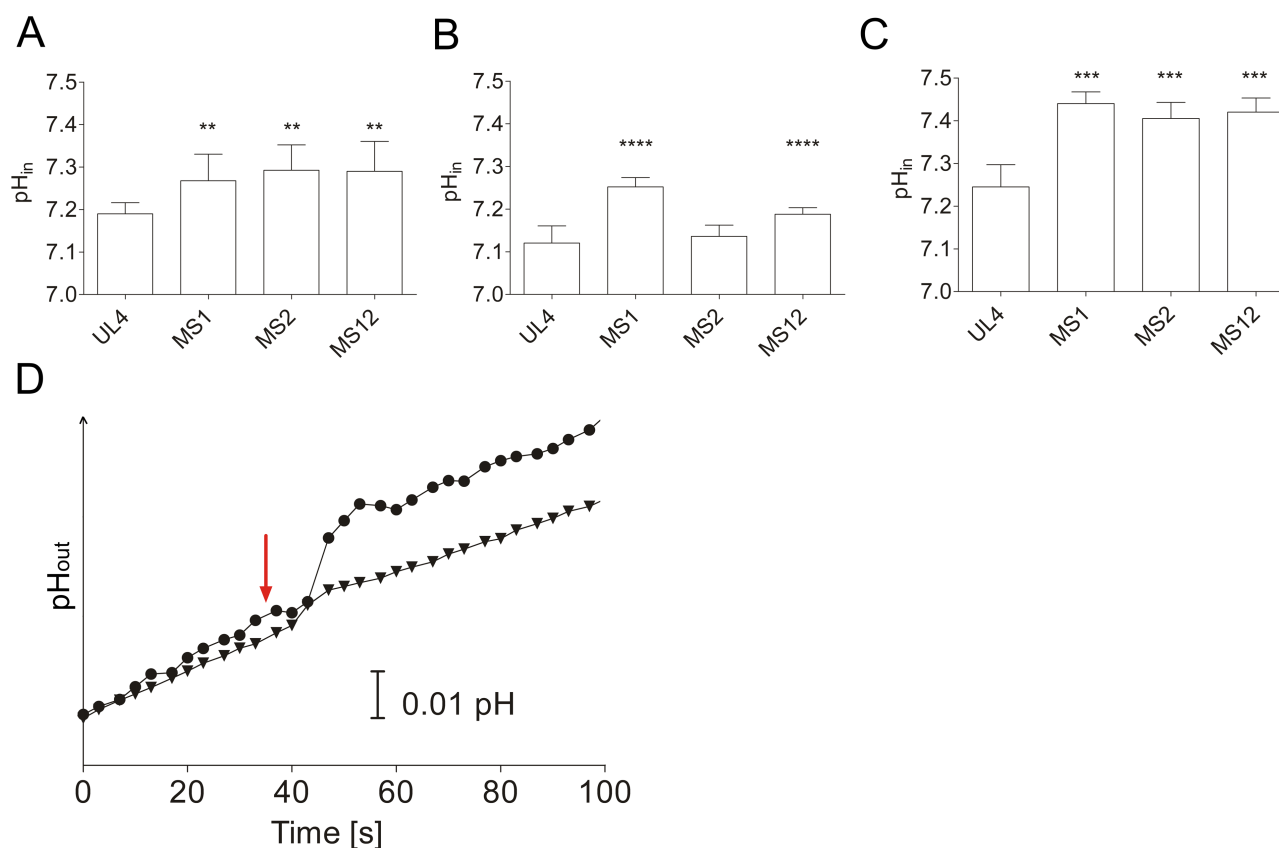


Fig. 5. Changes in intracellular and extracellular pH upon deletion of *STL* genes in *Zygosaccharomyces rouxii* cells. Intracellular pH of *Z. rouxii* UL4 and its *stl* derivatives (MS1, *stl1Δ*; MS2, *stl2Δ*; MS12, *stl1Δ stl2Δ*) was measured using the expression of pHluorin from the pZpH plasmid. The results are presented as the means \pm SD of at least five biological replicates assayed in duplicate. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ (two-tailed Student's *t*-test versus *Z. rouxii* UL4).

A. Intracellular pH of cells grown in YNB-pH with 2% glucose to $A_{600} = 0.5$.

B. Intracellular pH of cells pre-grown in YNB-pH with 2% glucose to $A_{600} = 0.5$ and then transferred into YNB-pH with 2% mannitol. pH was estimated after 2 h of incubation at 30°C.

C. Intracellular pH of cells pre-grown in YNB-pH with 2% glucose to $A_{600} = 0.5$ and then transferred into fresh YNB-pH with 2% glucose. pH was estimated after 2 h of incubation at 30°C.

D. Changes in external pH upon addition of glycerol. UL4 (●) and MS12 (*stl1Δ stl2Δ*, ▼) cells were suspended in water (pH adjusted to 5.3). The external pH was monitored with a pH electrode. Glycerol addition (final concentration 25.9 mM) is indicated by an arrow. Representative data of two biological replicates assayed in triplicate are shown.

nor *Sa. cerevisiae* cells showed any signs of Pma1p activation (i.e. a higher efflux of protons) by mannitol and galactose (Fig. 6A). This observation was confirmed by monitoring the acidification of external media after addition of various carbon sources (Fig. 6B). As shown in Fig. 6B, only the addition of fructose and glucose resulted in a significant increase in the acidification of external media.

Taken together, our data obtained in pH measurements indicated (i) that glycerol enters *Z. rouxii* cells via Stl proteins in symport with protons, (ii) that the deletion of *STL* genes influenced the intracellular pH and thus probably the overall metabolism and growth of *Z. rouxii* even under standard non-stressed conditions, and (iii) that ZrPma1p is activated by glucose and fructose similarly as ScPma1p.

Expression of ZrSTL1 is highly regulated whereas ZrSTL2 is more constitutive

To elucidate the regulation of the expression of ZrStl1 and ZrStl2 glycerol transporters, we analysed the level of expression of the corresponding genes in *Z. rouxii* UL4 cells grown under various conditions. In the first experiment, we tested the expression of both genes in cells grown up to the mid-exponential phase in YP supplemented with various sources of carbon or by a moderate (0.4 M) concentration of NaCl. The results obtained showed that both genes, and especially ZrSTL1, were upregulated when a carbon source such as mannitol was used (Fig. 7A). Surprisingly, a mild long-term hyperosmotic stress caused by 0.4 M NaCl resulted in a much lower increase in expression.

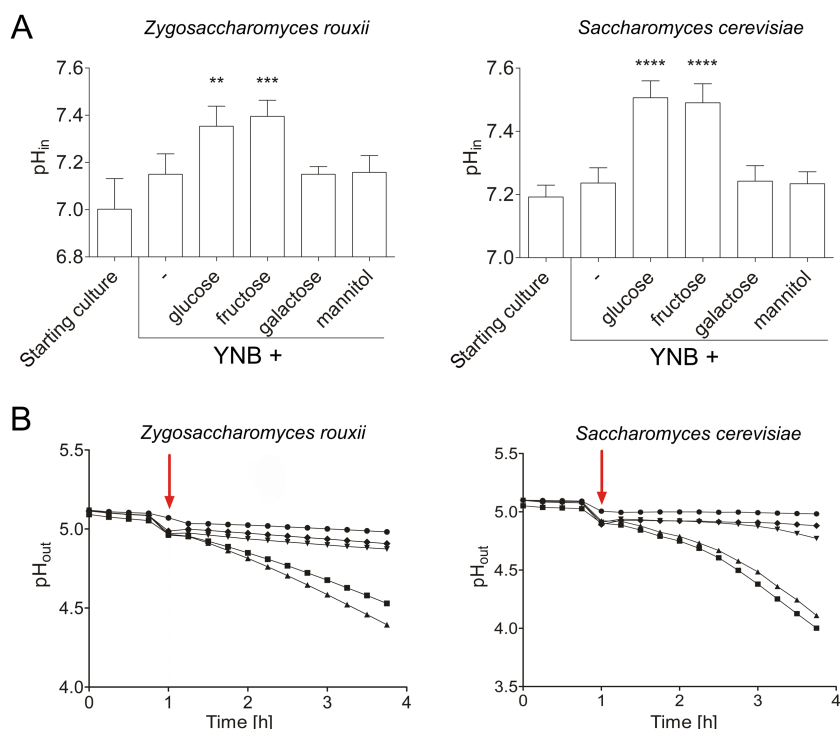


Fig. 6. Activation of Pma1 in *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* cells. A. Changes in intracellular pH of *Z. rouxii* UL4 [pZpH] and *Sa. cerevisiae* AQ [pVT-pH] after transfer to the fresh YNB medium with indicated 2% carbon source. Starting culture, cells grown in YNB + 2% glucose to $A_{600} = 0.5$ for *Z. rouxii*, and to $A_{600} = 0.4$ for *Sa. cerevisiae*. The results are presented as the means \pm SD of at least two biological replicates assayed in triplicate. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ (two-tailed Student's *t*-test versus starting culture). B. Acidification of YNB medium by *Z. rouxii* UL4 and *Sa. cerevisiae* AQ after addition of 2% carbon sources (■, glucose; ▲, fructose; ▼, galactose; ◆, mannitol) or water (●, negative control). The addition of a carbon source is indicated by an arrow. Representative data of two biological replicates assayed in triplicate are shown.

To monitor changes in expression, YPD pre-grown cells were transferred into fresh YP media with the indicated carbon sources and the level of *STL* transcripts was estimated after 30 min of incubation. As shown in Fig. 7B, mannitol, sorbitol, glycerol and maltose elicited a rapid increase in the expression of both genes, but again more significantly for *ZrSTL1*. Unlike the first

experiment, both genes were substantially upregulated within 30 min after the transfer of cells to a medium with 1 M salts (Fig. 7B). Figure 7C shows a very important difference in the expression of *Z. rouxii STL* genes. Only *ZrSTL1* seemed to be repressed by fructose, whereas the expression of *ZrSTL2* is similar in the presence of fructose and glucose.

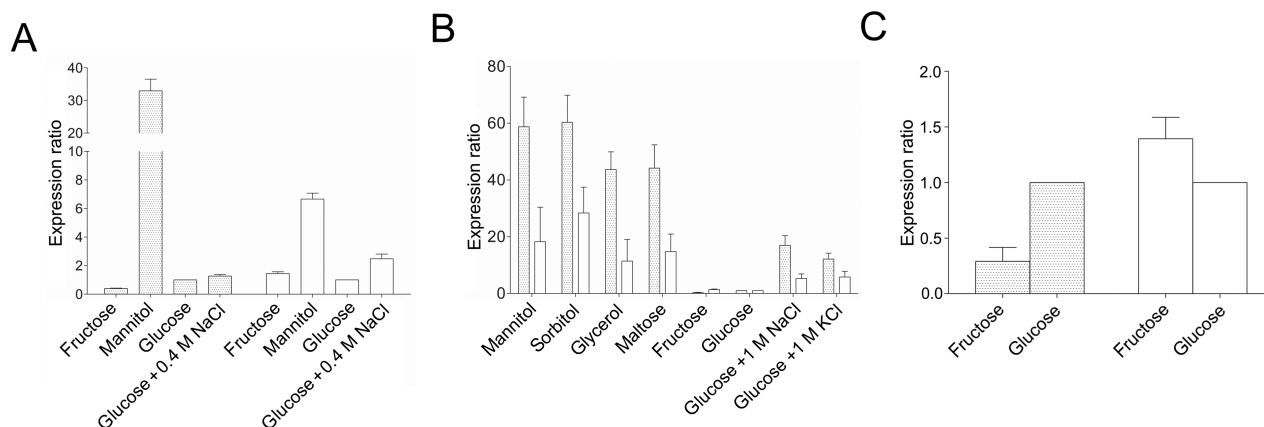


Fig. 7. Expression of *ZrSTL1* (shaded bars) and *ZrSTL2* (open bars) was followed by qRT-PCR in UL4 cells. The mRNA levels were normalised to *ZrACT1*. The expression ratio is presented as the multiple of the expression in the presence of 2% glucose. The results are presented as the mean \pm SD of three biological replicates assayed in triplicate.

A. Expression levels in cells from mid-exponential growth phase in YP media with 2% indicated carbon sources.

B. Expression levels in cells pre-grown in YPD ($A_{600} = 0.6$) and subsequently transferred to YP media supplemented with 2% carbon sources as indicated or to YPD + 1 M NaCl/KCl for 30 min.

C. Relative expression of *ZrSTL1* and *ZrSTL2* genes in cells from exponential phase of growth in YP media with 2% glucose or 2% fructose.

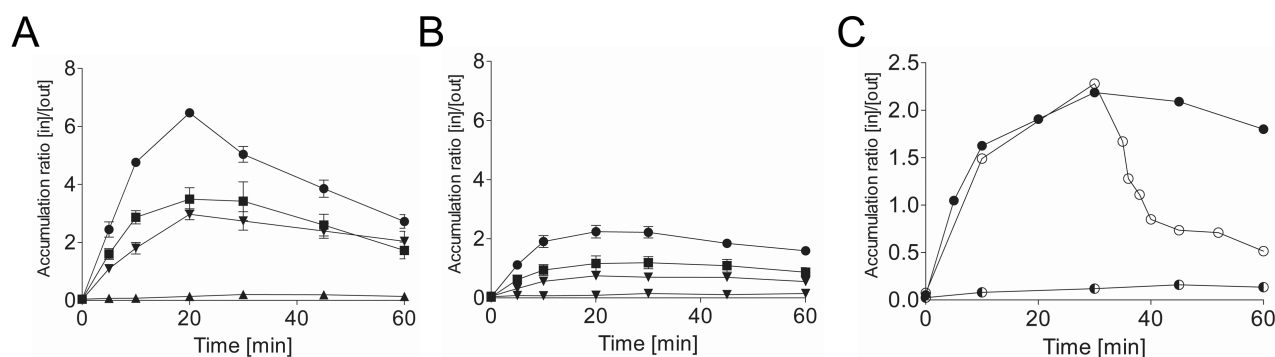


Fig. 8. Accumulation of ^{14}C -glycerol in UL4 (●), MS1 ($stl1\Delta$, ■), MS2 ($stl2\Delta$, ▼), and MS12 ($stl1\Delta stl2\Delta$, ▲) cells. Each point represents a mean \pm SD of three biological replicates.

A. Accumulation of ^{14}C -glycerol in cells from the exponential growth phase in YP + 2% glucose.

B. Accumulation of ^{14}C -glycerol in cells from the exponential growth phase in YP + 2% fructose.

C. Accumulation of ^{14}C -glycerol in UL4 cells growing in YEPG. The accumulation was monitored in the absence (close symbols) or in the presence (semi-opened symbol) of 50 μM CCCP. Open symbols represent the changes in accumulation ratios upon addition of 50 μM CCCP, 35 min from the beginning of experiment.

To confirm the results obtained in RT-PCR experiments, we measured the accumulation ratios of glycerol in cells grown in YP with either glucose or fructose as a source of carbon. As shown in Fig. 8, glycerol was accumulated in higher levels in cells grown in glucose than in cells grown in fructose. The results obtained were in agreement with the observed repression of the *ZrSTL1* gene in the presence of fructose (Fig. 7C). To reconfirm the active mechanism of glycerol uptake and the proton motive force as a source of energy, the accumulation of glycerol in UL4 cells was monitored in the presence of carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), a protonophore that was added either together with radiolabelled glycerol or 35 min later. As shown in Fig. 8C, glycerol accumulation was completely prevented in the presence of CCCP, and the already accumulated glycerol was released when the inward gradient of protons was dissipated.

A detailed kinetic characterisation of ^{14}C -glycerol uptake via *ZrStl1p* and *ZrStl2p* revealed that both transporters have similar affinity to glycerol in the mM range (Table 2), although *ZrStl1p* seemed to have a slightly higher affinity and lower capacity (Table 2, Fig. S3A). The measurement of initial uptake rates in *Z. rouxii* MS2 ($stl2\Delta$) showed that apart from *Stl1p*, there was present a third, low-affinity transporter (Table 2, Fig. S3B).

Fructose produced by *Z. rouxii* invertase blocks glycerol accumulation

To further confirm the results obtained in RT-PCR experiments, we monitored the uptake of glycerol in cells grown with sucrose as a source of carbon. Yeasts usually do not contain a sucrose transporter. Instead, *Sa. cerevisiae* and some other yeast species produce the extracellular enzyme invertase to break sucrose down into two monosaccharides, glucose and fructose (Albertyn *et al.*, 1994) which are taken up by specific hexose transporters. We found a homologue of the invertase-encoding *ScSUC2* gene (YIL162w) in the genome of *Z. rouxii* (ZYRO0B13376g). Based on this finding and on the fact that *Z. rouxii* grows with sucrose as a source of carbon, we expected the production of invertase by *Z. rouxii*. With glucophilic *Sa. cerevisiae*, glucose is preferentially transported and metabolised, whereas in fructophilic *Z. rouxii*, fructose is used prior to glucose (Emmerich and Radler, 1983; Leandro *et al.*, 2014). We measured the accumulation of glycerol during the growth of *Z. rouxii* UL4 in YP + 50% sucrose, i.e. in the presence of hyperosmotic stress. We found that the glycerol accumulation differed depending on the growth phase (Fig. S4). At the beginning of growth (growth phase I), cells produced invertase and

Table 2. Kinetic parameters of glycerol uptake in cells from the exponential phase of growth in YPD ($A_{600} = 0.6$).

Strain	Transporter	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\text{g d.w}^{-1}$)
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> MS1	<i>Stl2p</i>	3.99 ± 0.52	145.00 ± 11.75
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> MS2	<i>Stl1p</i>	0.73 ± 0.30	46.21 ± 8.38
	Unknown transporter	28.60 ± 6.51	546.10 ± 92.99

sucrose was broken down into glucose and fructose. The glycerol uptake was negligible at this point because of the high concentration of fructose, which is taken up by cells before glucose (Leandro *et al.*, 2014). This result also showed that the repression (and/or inactivation) of ZrStl proteins by fructose is stronger than the upregulation of their expression caused by the high osmotic pressure (50% sugars in the medium). Over time, fructose was successively consumed and cells then started to transport and metabolise glucose (growth phase II; Leandro *et al.*, 2014) and accumulate radiolabelled glycerol. When both monosaccharides were consumed (growth phase III), cells continued to transport glycerol. These results supported the finding that the uptake of glycerol is affected more by fructose than by glucose in fructophilic *Z. rouxii*.

Discussion

Active glycerol uptake systems are believed to exist in most yeast species. The name of the transporters, Stl, is the abbreviated version of Sugar Transporter Like and is based on their similarity to hexose transporters (Zhao *et al.*, 1994). Members of the Stl family share a strong structural conservation typical of hexose transporters such as 12 transmembrane domains (TMD) and five sequence-conserved motifs (Zhao *et al.*, 1994; Leandro *et al.*, 2009). A detailed search for putative glycerol Stl transporters in the sequenced genomes of various yeast species revealed that the genomes of osmotolerant yeasts usually contain more than one copy of a homologous gene [e.g. eight in *D. hansenii*, six in *Yarrowia lipolytica* or three in *Pichia stipitis* (Fig. 9, Table S3 and Palma *et al.*, 2007)]. Subsequent analysis showed that identified Stl proteins can be divided into three subfamilies (Fig. 9). The first and biggest subfamily, named 'ScStl1' based on the high level of identity with ScStl1p, contains transporters sharing approximately 60% identity, including CaStl1p as well as both putative Stl transporters from *Z. rouxii*. The second and more distant subfamily ('CaStl2') involves proteins highly similar to CaStl2p. The level of identity among the members of this subfamily is between 50% and 60%. Neither the transport function nor the physiology role of any of them has been fully characterised. Recently described proteins from *P. tannophilus* are also members of this subfamily, but their function in glycerol uptake or homeostasis has not been confirmed (Liu *et al.*, 2013). The third subfamily includes proteins with a relatively low level of identity to the first two groups (around 27%) and a completely unknown role in cells.

The position of the two *Z. rouxii* homologues within the first subfamily, which contains the only two transporters to have so far been characterised from *S. cerevisiae* and *C. albicans*, suggested their function in active glycerol uptake. Our results provide several lines of evidence sup-

porting the conclusion that *Z. rouxii* takes up glycerol actively via two H⁺ symporters, the proteins Stl1 and Stl2.

Our first approach, the expression of the *Z. rouxii* STL genes in *Sa. cerevisiae* cells, was only partly successful. Introduction of the ZrSTL1 gene into *Sa. cerevisiae* mutants resulted in clear phenotypes corresponding to the presence of an active glycerol uptake system (Fig. 1A and C), and measurements of glycerol accumulation confirmed this conclusion (Fig. 1B and D). On the other hand, STL2 expression neither complemented the salt-sensitivity nor the absence of active glycerol accumulation (Fig. 1). As for the 87 amino acid longer hydrophilic N-terminus of Stl2p (Fig. S1), we first hypothesised that Stl2p may serve as a sensor of external glycerol, like the *Sa. cerevisiae* sensors for amino acids [Ssy1p; (Klasson *et al.*, 1999)] or sugars [Rgt2p, Snf3p; (Ozcan *et al.*, 1996)] that are only distinguished from relevant groups of transporters by longer hydrophilic N- or C- termini. Nevertheless, experiments with *Z. rouxii* cells showed that ZrStl2p is an active glycerol transporter like the ZrStl1 and not a glycerol sensor.

The construction of *Z. rouxii* mutants lacking one or both of the STL genes revealed that the absence of STL1 and STL2 strongly affected the growth of mutants under osmotic stress (e.g. Fig. 4, 1 M NaCl, Fig. S2B) and their ability to actively accumulate glycerol (Figs. 2C, 4C). The observed osmosensitivity of the *Z. rouxii* mutants lacking STL genes seems to be rather species-specific; the growth of the *C. albicans* stl1Δ homozygous mutant in minimal YNB medium supplemented with 1 M NaCl is not inhibited (Kayingo *et al.*, 2009). The *Z. rouxii* wild-type phenotype of salt tolerance and the ability to accumulate glycerol were restored in the MS12 cells (stl1Δ stl2Δ) by the reintroduction of the STL1 or STL2 genes (Fig. 4A and C). These results showed that Stl1 and Stl2 are both glycerol transporters. Moreover, our comparison of the wild type and single and double mutants indicated that the *Z. rouxii* Stl proteins are active glycerol transporters whose physiological role is not limited to the accumulation of a compatible solute during hyperosmotic stress, but whose activity contributes to cell fitness even under standard, non-stressed growth conditions (Figs. 2A, 2B, 5A, Fig. S2B). *Z. rouxii* cells needed functional Stl transporters for their growth on minimal media, and this need was much stronger in cells with multiple auxotrophies (DLA2, Fig. S2B). In *Z. rouxii*, observed phenotypes might be related to the cell metabolism in auxotrophes and probably connected, like in *Sa. cerevisiae*, with an altered redox homeostasis (Vandijken and Scheffers, 1986; Ansell *et al.*, 1997; Larsson *et al.*, 1998). It is worth noting that, unlike *Sa. cerevisiae*, *Z. rouxii* CBS 732^T cells do not use glycerol as a source of carbon (Kurtzman *et al.*, 2010; Bubnova *et al.*, 2014), and thus the role of ZrStl transporters is not nutritive. Both *C. albicans* and *Sa. cerevisiae* do not seem to be affected by the absence of the STL1 gene under non-

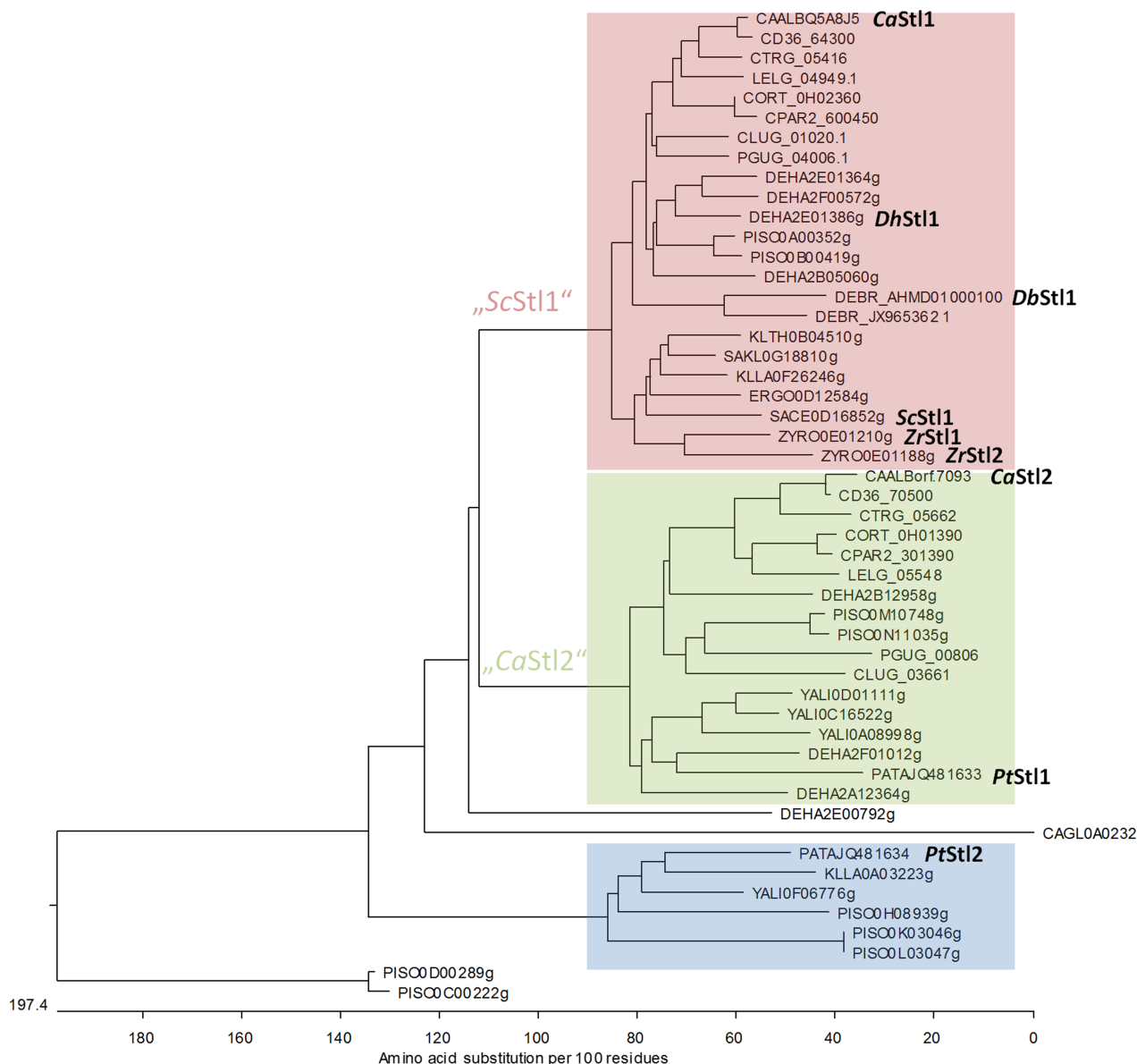


Fig. 9. Phylogenetic tree of Stl proteins from *Zygosaccharomyces rouxii* CBS 732^T (ZYRO), *Saccharomyces cerevisiae* S288C (SACE), *Candida albicans* SC5314 (CAALB), *Debaryomyces hansenii* CBS 767 (DEHA), *Pachysolen tannophilus* CBS 4044 (PATA) and uncharacterised homologues of Stl1 proteins from *Candida glabrata* CBS 138 (CAGL), *Candida dubliniensis* CD36 (CD36), *Candida tropicalis* MYA-3404 (CTRG), *Candida parapsilosis* CDC317 (CPAR), *Candida orthopsilosis* Co 90–125 (CORT), *Candida guilliermondii* ATCC 6260 (PGUG), *Candida lusitanae* ATCC 42720 (CLUG), *Dekkera bruxellensis* CBS 2499 (DEBR), *Pichia sorbitophila* CBS 7064 (PISO), *Yarrowia lipolytica* CLIB122 (YALI), *Kluyveromyces lactis* CLIB210 (KLLA), *Kluyveromyces thermotolerans* CBS 6340 (KLTH), *Saccharomyces kluyveri* CBS 3082 (SAKL) and *Lodderomyces elongisporus* NRLL YB-4239 (LELG). SeqBuilder and MegAlign were used to see, edit and align sequences (Clustal W method).

stressed conditions (Ferreira and Lucas, 2007; Kayingo *et al.*, 2009; Duskova *et al.*, 2015). In *Z. rouxii*, the strongest osmosensitivity of *stl* mutants was observed when mannitol was used as a source of carbon (e.g. Figs. 3C and 4A). The presence of at least one Stl glycerol uptake system and a low amount of glycerol (10 mM) was necessary to support the growth of cells in media with high

concentrations of salts or other solutes (Fig. 3C). On the other hand, the absence of the *STL1* gene (strains MS1 and MS12) was advantageous for cell growth in minimal medium supplemented with only 2% mannitol and 10 mM glycerol; i.e. without an osmotic stress (Fig. 3C; bottom left panel). This surprising phenotype is probably due to the catabolism of mannitol and glycerol. It was shown that

glycerol formation may occur in *Z. bailii* under strictly aerobic conditions (Vandijken and Scheffers, 1986) and the situation may be the same in its close relative *Z. rouxii*. When mannitol is catabolised by mannitol dehydrogenase, NAD(P)H is generated, and to restore the NAD(P)⁺/NAD(P)H equilibrium, glycerol is usually generated in yeast cells (Vandijken and Scheffers, 1986; Quain and Boulton, 1987; Perfect *et al.*, 1996). Under the conditions used in our experiments with *Z. rouxii* cells, mannitol as a source of carbon was catabolised and thus surplus NAD(P)H was probably generated. As external glycerol was simultaneously taken up via Stl transporters (and mainly via Stl1p, cf. Fig. 7, expression on mannitol), it was probably synthesised less to restore the NAD(P)⁺. Another reason for a slower growth of the wild type on the medium with mannitol and glycerol may be the competition of both compounds for the energy source necessary for the active uptake (proton motive force). As nothing is known on the mechanism of mannitol transport and metabolism, or on the maintenance of redox balance in *Z. rouxii* cells, our presumption is only based on the known pathways in *Sa. cerevisiae*, and mannitol transport and its catabolic pathways together with the metabolic basis for glycerol formation or degradation in *Z. rouxii* should be elucidated.

Both *Z. rouxii* Stl transporters had similar kinetic parameters (Table 2), were localised to the plasma membrane (Fig. 4B), contributed similarly to glycerol uptake, osmotolerance (Figs. 2C, 3 and 4A), cell fitness and survival of hypoosmotic shock (Fig. 2D), and surprisingly, the presence of both was necessary to maintain intracellular pH (Fig. 5A and C). Nevertheless, Stl1p seemed to have a predominant role when non-fermentable sources of carbon were used (Fig. 7B). Its expression was highly upregulated (Fig. 7A and B) and its activity predominated when cells were grown e.g. with mannitol (Figs. 3C and 5B). The *stl1Δ* mutant also produced more glycerol than *stl2Δ* cells under standard growth conditions (Fig. 2B; YPD medium). Expression of the *STL1* gene changed more with varying growth conditions (Fig. 7A and B) and was repressed more efficiently by the presence of fructose (Fig. 7C).

Almost a quarter of a century ago, glycerol was believed to be transported through the cytoplasmic membrane in symport with Na⁺ in *Z. rouxii* cells (van Zyl *et al.*, 1990). Also for several other salt-tolerant yeast species, e.g. *D. hansenii* (Lucas *et al.*, 1990), glycerol was presumed to be actively taken up together with sodium cations (Lages *et al.*, 1999). In all of those experiments, the uptake of glycerol was measured in the presence of NaCl. Here we show that both *Z. rouxii* Stl transporters use the inward gradient of protons across the plasma membrane created by the Pma1 H⁺-ATPase (Fig. 5D). The phenotypes of Stl activity were observed in the absence of salts (e.g. Fig. 3 and S4), the accumulation of glycerol was inhibited by the presence of a protonophore

(Fig. 8C), and the absence of Stl transporters affected the intracellular pH (Fig. 5A–C) and the alkalisation of external medium upon glycerol addition (Fig. 5D).

Taken together, our results showed that the osmotolerant and fructophilic yeast *Z. rouxii* employs two plasma-membrane transport systems, Stl1p and Stl2p, mediating the active uptake of glycerol with protons. These transporters are highly important, though *Z. rouxii* CBS 732^T cells do not use external glycerol as a source of carbon (Kurtzman *et al.*, 2010; Bubnova *et al.*, 2014). Both transporters participate not only in the high osmotolerance of this species, as expected, but their activity also contributes to the survival of a hypoosmotic stress. Unlike in *Sa. cerevisiae*, the two Stl transporters are also active in *Z. rouxii* cells grown under standard non-stressed conditions (YPD or YNB with glucose) and their activity contributes to the maintenance of glycerol and intracellular pH homeostases. The expression of Stl1p is tightly regulated, being highly activated in non-fermentable carbon sources and downregulated by fructose. The expression of Stl2p is less regulated and resembles those of house-keeping genes. The characterisation of active glycerol uptake and the properties of the transporters involved in osmotolerant *Z. rouxii* may serve as the basis for improving the osmotolerance of the industrial yeast strains used in fermentation processes in environments with a low water activity.

Experimental procedures

Yeast strains and growth media

The yeast strains used in this study are listed in Table 1. Mutant strains of *Z. rouxii* lacking *STL1*, *STL2* or both are derivatives of *Z. rouxii* UL4 (*ura3*) and *Z. rouxii* DLA2 [*ura3 leu2Δ::loxP ade2Δ::loxP*; (Pribylova and Sychrova, 2003; Pribylova *et al.*, 2007b)]. The *ZrSTL1* and *ZrSTL2* genes were deleted by homologous recombination using the Cre-*loxP* system (Guldener *et al.*, 1996) with the *KanMX* marker gene, then pZCRE (Pribylova *et al.*, 2007b) and the primers listed in Table S2. *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was routinely used as the host for plasmid amplification.

Yeast batch cultures were grown aerobically (30°C, 160 r.p.m.) in complex YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose), YEPG (1% yeast extract, 2% peptone, 1% ethanol, 1% glycerol) or minimal YNB (0.67% YNB without amino acids, 2% glucose). For growth test on various carbon sources, fructose, mannitol, sorbitol, maltose and galactose at the indicated concentration were in the media instead of glucose. The addition of mannitol, sorbitol, NaCl or KCl (at concentrations indicated in the text) was used to test growth under high osmotic pressure. YNB-pH (0.17% YNB without ammonium sulphate, without folic acid, without riboflavin (MP Biomedicals); 0.4% ammonium sulphate) supplemented with indicated 2% source of carbon was used to prepare cultures for the measurement of intracellular pH. When required, auxotrophic supplements BSM (Brent Supplement Mix, FormediumTM, Hunstanton, UK), BSM without uracil or G418

(100 µg ml⁻¹, Formedium™, UK) were used for transformant selection. Solid media contained 2% agar. *E. coli* transformants were grown in standard Luria-Bertani medium supplemented with ampicillin (100 µg ml⁻¹).

Plasmids

The plasmids used in this study are listed in Table S1. All new plasmids were constructed by homologous recombination in *Sa. cerevisiae* BW31a. The primers for the construction of all plasmids are listed in Table S2. Genomic DNA of *Z. rouxii* UL4 was isolated as described earlier (Hoffman and Winston, 1987) and used as a template for the amplification of the required fragments containing *ZrSTL1* or *ZrSTL2* genes. *ZrSTL1* and *ZrSTL2* with their own promoters (2000 nt long) were inserted into two *Z. rouxii* vectors (pZCA, pZGFP). All constructed plasmids were verified by PCR using diagnostic primers and by sequencing.

Growth assays

The growth of yeast cells was monitored on solid and in liquid media. The growth rate measurements in liquid media were performed in 96-well plates according to (Maresova and Sychrova, 2007). For drop tests on solid media, cells pre-grown on YPD or on YNB plates at 30 °C for 48 h were suspended in sterile water to $A_{600} = 2$ (Spekol 211, Carl Zeiss, Jena, Germany). Serial 15-fold dilutions of cell suspensions were spotted on YPD or YNB plates without or supplemented with various carbon sources, salts or glycerol as indicated. All experiments were repeated at least three times and representative results are shown.

Survival of stress

To determine the tolerance of *Z. rouxii* wild-type and mutant strains to hyperosmotic and hypoosmotic stresses, cells were grown to $A_{600} = 0.6$ in 50 ml of YPD. Cultures were transferred to YP + 1 M of mannitol or YPD + 1 M of KCl for 16 h and then to H₂O for 45 min. In each step of this procedure, the A_{600} of cells was adjusted to 1.0 and subsequently, 50 µl of 2000-fold and 100 µl of 20,000-fold diluted aliquots were plated on YPD in triplicate. The number of colonies (CFU) was counted after 2 days of growth. The experiment was repeated three times and the means ± SD are shown.

Glycerol production

To analyse the total production of glycerol, cells were grown in three parallels in 20 ml of YPD media to $A_{600} = 1$. Two aliquots of 1 ml were then withdrawn, boiled for 10 min, mixed intensively with a vortex and centrifuged (14,000 g; 10 min). The glycerol concentration was measured in the supernatant using an EBO glycerol kit (Roche CZ, Prague, Czech Republic). The presented results are the means ± SD of three biological replicates assayed in triplicate.

Glycerol uptake and accumulation

To estimate the initial rates of uptake of radiolabelled glycerol and the [in]/[out] accumulation ratios, we used the methods

described earlier (Lages and Lucas, 1995). Cells grown in 100 ml of media (indicated in the text) were harvested in the mid-exponential growth phase (usually $A_{600} = 0.6$; $A_{600} = 0.4$ for *Sa. cerevisiae* grown in YNB without uracil), washed twice with ice-cold distilled water and resuspended to a final concentration of about 30 mg (dry weight) ml⁻¹ in distilled water. To follow the initial uptake rates or glycerol accumulation, aqueous solutions of ¹⁴C-glycerol ([¹⁴C(U)] glycerol, ARC, St Louis, MO, USA) with specific activities of 200 dpm nmol⁻¹ were used. The initial uptake rates were estimated in triplicate for each glycerol concentration, and related to a blank value obtained by inverting the sequence of glycerol and cold water addition to the cell suspension. Reported data are the mean ± SD of at least five biological replicates. Kinetic parameters were estimated from Eadie-Hofstee plots and confirmed by computer nonlinear regression analysis using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). The ability to release accumulated radiolabelled glycerol was assayed with 50 µM protonophore CCCP added either 35 min after, or simultaneously with the radiolabelled glycerol. The experiments estimating the glycerol accumulation ratios were repeated at least three times and the means ± SD are presented. The radioactivity of cell samples was measured in vials containing 5 ml of scintillation counting cocktail (Opti-Phase HiSafe II, LKB FSA Laboratory Supplies, Loughborough, UK) in a Packard Tti-Carb 2200CA liquid scintillation spectrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

H⁺ movements associated with glycerol uptake

The existence of an H⁺ influx associated with initial glycerol uptake was monitored as described previously (Loureiro-Dias and Peinado, 1984; Leandro *et al.*, 2013). Cells grown in 100 ml of YPD were harvested in the mid-exponential growth phase ($A_{600} = 0.7$ – 0.8), washed twice with ice-cold distilled water, resuspended to a final concentration of about 25 mg (dry weight) ml⁻¹ in ice-cold distilled water and kept on ice; 0.9 ml of cell suspension was mixed with 1.36 ml of water and pH was adjusted to 5.3 with HCl. Cells were incubated in a heated chamber with magnetic stirring (Oxygraph-2K; OROBOROS® Instruments, Innsbruck, Austria) at 25°C. After obtaining a baseline, 60 µl of 1 M glycerol was added (final concentration 25.9 mM), and pH data were collected with a pH electrode (Hamilton, Reno, NV, USA) connected to OROBOROS Oxygraph-2K in number of second intervals. The experiment was repeated twice in triplicate and representative results are shown.

Intracellular pH

The intracellular pH was determined in *Z. rouxii* and *Sa. cerevisiae* transformed with the pZpH, and pHl-U plasmids, respectively, carrying the sequence of pHluorin (Maresova *et al.*, 2010; Stribny *et al.*, 2012). The calibration curves for *Sa. cerevisiae* and *Z. rouxii* were generated as described previously with some modifications (Orij *et al.*, 2009). Ten millilitres of cells grown to $A_{600} = 0.5$ in YNB–pH medium with appropriate auxotrophic supplements were harvested, washed with 10 ml of PBS (Sigma CZ, Prague, Czech Republic) and resuspended in 10 ml of PBS containing digitonin

(450 µg ml⁻¹ for *Z. rouxii*; 150 µg ml⁻¹ for *Sa. cerevisiae*). Diginonin was washed out after 17 min (*Z. rouxii*) or 8 min (*Sa. cerevisiae*); cells were resuspended in 1 ml of PBS and kept on ice. The wells of the ELISA plate (flat-bottom, PS) were filled with 10 µl of cell suspension and 90 µl of eight citric acid/Na₂HPO₄ buffers of different pH (ranging from 5.7 to 7.7; McIlvaine's buffer system). The fluorescence intensities were recorded using a Synergy HT microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) with a 516/20 nm emission filter and 400/30 nm and 485/20 nm excitation filters. For eliminating the background fluorescence, wild-type cultures with an empty vector (pZEU for *Z. rouxii*, pVT100-U for *Sa. cerevisiae*) were grown and treated in parallel, and their fluorescence values were subtracted from the fluorescence at each excitation wavelength (software Gen 5, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Calibration curves were obtained by plotting the ratio of emission at both excitation wavelengths ($I_{400/485}$) against the pH of buffers (data were fitted to a third-degree polynomial regression).

To estimate the pH of the cytosol, cells were grown in YNB-pH with 2% glucose to the mid-exponential growth phase ($A_{600} = 0.5$ – 0.6 for *Z. rouxii*, $A_{600} = 0.4$ for *Sa. cerevisiae*). The pH was estimated directly in the growing culture using the 96-well plates, and the background fluorescence was estimated and subtracted as described earlier. The results are presented as the means \pm SD of at least five biological replicates assayed in duplicate.

Acidification of external medium

The acidification of media upon addition of various carbon sources was performed as described previously (Maresova and Sychrova, 2007). *Z. rouxii* UL4 and *Sa. cerevisiae* AQ cells from overnight cultures grown in YPD were washed twice with YNB without carbon source and resuspended to final $A_{600} = 0.1$ in the same medium containing pH indicator (0.01% bromocresol green sodium salt). After 60 min, the indicated carbon sources (5 µl of 40% solution of glucose, fructose, galactose and mannitol) or 5 µl of distilled water (negative control) were added. The changes in absorbance (A_{595}) were recorded in an ELx808 Absorbance Microplate Reader (BioTek Instruments). The experiment was done in two biological replicates assayed in triplicate. The calibration and external pH calculations were performed as in (Maresova and Sychrova, 2007).

Gene expression (qRT-PCR)

For qRT-PCR experiments, *Z. rouxii* UL4 cells were grown in different types of media up to the mid-exponential growth phase. Three 2 ml aliquots from each culture were centrifuged and the mRNA from the pellet immediately isolated using RNA Blue (Top-Bio, Prague, Czech Republic) following the manufacturer's instructions. The concentration and quality of obtained mRNA was verified by NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA). The concentration of isolated mRNA was adjusted to the same concentration for all samples and the remaining DNA was removed by DNase I treatment (DNase I, without RNase, Top-Bio). The mRNA samples were reverse-transcribed to

cDNA with a high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The cDNA samples were quantified by real-time PCR in a ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life Technologies) using 5× HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (ROX; Solis BioDyne, Tartu, Estonia) and TagMan Assays (Generi-Biotech, Hradec Kralove, Czech Republic) specific for *Z. rouxii* UL4's *ZrSTL1* (*ZrSTL1_Q2*, Order No: 00187-13), *ZrSTL2* (*ZrSTL2_Q1*, Order No: 00187-13) and *ZrACT1* (*ZrACT1_Q1*, Order No: 00187-13). The expression of the *ZrACT1* gene, encoding actin, was estimated in each experiment to normalise the mRNA expression in each sample. Each PCR reaction was performed in triplicate in a final volume of 10 µl using target genes labelled with FAM. The quantity of the transcript was determined using the standard curve method with 10-fold dilution of the mixed cDNA sample. The results are presented as the means \pm SD of three biological replicates assayed in triplicate.

Fluorescence microscopy

Yeast cells producing Stl proteins tagged with C-terminal GFP were grown in YNB with 2% glucose to the exponential growth phase. The fluorescence signal was observed under an Olympus AX (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) 70 microscope using a U-MWB cube with a 450–480 nm excitation filter and 515 nm barrier filter or under Nomarski contrast.

In silico analyses

The sequences of DNA and proteins were obtained from the Génolevures (Sherman *et al.*, 2009), SGD (*Saccharomyces* Genome Database; Cherry *et al.*, 2012) and CGD (*Candida* Genome Database Inglis *et al.*, 2012) databases. The multiple sequence alignment and comparative analyses were performed using the DNASTAR Lasergene 11 Core Suite (DNASTAR, Madison, WI, USA). The TMHMM (TransMembrane prediction using Hidden Markov Models) server v. 2.0 was used to predict the number of transmembrane domains (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Statistics

Data were analysed in GraphPad Prism 5 and *P*-values were calculated using the two-tailed Student's *t*-test.

Acknowledgements

The help of Dr. P. Ergang with the real-time PCR experiments is gratefully acknowledged. We thank O. Zimmermannova for critical reading of the paper. This work was supported by the following grants: Grant Agency of the Czech Republic P503/10/0307, institutional concept RVO:6798582, Grant Agency of the Charles University 299611/2011/B-Bio/PrF, an Lifelong Learning Programme ERASMUS practical placement grant and by Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional – Programa Operacional de Fatores de Competitividade – COMPETE and by national funds from Fundação para a Ciência e Tecnologia through the project PEstC/BIA/UI4050/2011.

References

- Ahmadpour, D., Geijer, C., Tamas, M.J., Lindkvist-Petersson, K., and Hohmann, S. (2014) Yeast reveals unexpected roles and regulatory features of aquaporins and aquaglyceroporins. *BBA* **1840**: 1482–1491.
- Albertyn, J., Hohmann, S., and Prior, B.A. (1994) Characterization of the osmotic-stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase independently. *Curr Genet* **25**: 12–18.
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., and Adler, L. (1997) The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J* **16**: 2179–2187.
- Banuelos, M.A., Sychrova, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L., and Potier, S. (1998) The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiol* **144** (Part 10): 2749–2758.
- Brewster, J.L., and Gustin, M.C. (2014) Hog1: 20 years of discovery and impact. *Sci Signal* **7**: re7.
- Brown, A.D. (1978) Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Adv Microb Physiol* **17**: 181–242.
- Bubnova, M., Zemancikova, J., and Sychrova, H. (2014) Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses. *Yeast* **31**: 309–321.
- Cherry, J.M., Hong, E.L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E.T., *et al.* (2012) *Saccharomyces* genome database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res* **40**: D700–D705.
- Czabany, T., Athenstaedt, K., and Daum, G. (2007) Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *BBA* **1771**: 299–309.
- Dakal, T.C., Solieri, L., and Giudici, P. (2014) Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Int J Food Microbiol* **185**: 140–157.
- Duskova, M., Borovikova, D., Herynkova, P., Rapoport, A., and Sychrova, H. (2015) The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions. *FEMS Microbiol Lett* **362**: 1–8.
- Edgley, M., and Brown, A.D. (1978) Response of xero-tolerant and non-tolerant yeasts to water stress. *J Gen Microbiol* **104**: 343–345.
- Emmerich, W., and Radler, F. (1983) The anaerobic metabolism of glucose and fructose by *Saccharomyces bailii*. *J Gen Microbiol* **129**: 3311–3318.
- Ferreira, C., and Lucas, C. (2007) Glucose repression over *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter gene *STL1* is overcome by high temperature. *FEBS Lett* **581**: 1923–1927.
- Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M.C., *et al.* (2005) A member of the sugar transporter family, St1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **16**: 2068–2076.
- Fleet, G. (1992) Spoilage yeasts. *Crit Rev Biotechnol* **12**: 1–44.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519–2524.
- Hoffman, C.S., and Winston, F. (1987) A 10-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267–272.
- Hohmann, S. (2002) Osmotic adaptation in yeast-control of the yeast osmolyte system. *Int Rev Cytol* **215**: 149–187.
- Inglis, D.O., Arnaud, M.B., Binkley, J., Shah, P., Skrzypek, M.S., Wymore, F., *et al.* (2012) The *Candida* genome database incorporates multiple *Candida* species: multispecies search and analysis tools with curated gene and protein information for *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Nucleic Acids Res* **40**: D667–D674.
- Iwaki, T., Tamai, Y., and Watanabe, Y. (1999) Two putative MAP kinase genes, *ZrHOG1* and *ZrHOG2*, cloned from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* are functionally homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* *HOG1* gene. *Microbiol* **145**: 241–248.
- Iwaki, T., Kurono, S., Yokose, Y., Kubota, K., Tamai, Y., and Watanabe, Y. (2001) Cloning of glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes (*ZrGPD1* and *ZrGPD2*) and glycerol dehydrogenase genes (*ZrGCV1* and *ZrGCV2*) from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast* **18**: 737–744.
- Izawa, S., Ikeda, K., Maeta, K., and Inoue, Y. (2004a) Deficiency in the glycerol channel Fps1p confers increased freeze tolerance to yeast cells: application of the *fps1Δ* mutant to frozen dough technology. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**: 303–305.
- Izawa, S., Sato, M., Yokoigawa, K., and Inoue, Y. (2004b) Intracellular glycerol influences resistance to freeze stress in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of a quadruple mutant in glycerol dehydrogenase genes and glycerol-enriched cells. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**: 108–114.
- Kayingo, G., Martins, A., Andrie, R., Neves, L., Lucas, C., and Wong, B. (2009) A permease encoded by *STL1* is required for active glycerol uptake by *Candida albicans*. *Microbiol* **155**: 1547–1557.
- Kinclova-Zimmermannova, O., and Sychrova, H. (2006) Functional study of the Nha1p C-terminus: involvement in cell response to changes in external osmolarity. *Curr Genet* **49**: 229–236.
- Kinclova-Zimmermannova, O., Zavrel, M., and Sychrova, H. (2005) Identification of conserved prolyl residue important for transport activity and the substrate specificity range of yeast plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporters. *J Biol Chem* **280**: 30638–30647.
- Klasson, H., Fink, G.R., and Ljungdahl, P.O. (1999) Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol Cell Biol* **19**: 5405–5416.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., and Boekhout, T. (2010) *The Yeast: A Taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier.
- Lages, F., and Lucas, C. (1994) Glycerol/H⁺ symport in the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila* – characterization of an electrogenic active-transport system. *Folia Microbiol* **39**: 528–529.
- Lages, F., and Lucas, C. (1995) Characterization of a

- glycerol/H⁺ symport in the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila*. *Yeast* **11**: 111–119.
- Lages, F., and Lucas, C. (1997) Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *BBA* **1322**: 8–18.
- Lages, F., Silva-Graca, M., and Lucas, C. (1999) Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiol* **145** (Part 9): 2577–2585.
- Larsson, C., Pahlman, I.L., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L., and Gustafsson, L. (1998) The importance of the glycerol-3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 347–357.
- Leandro, M.J., Fonseca, C., and Goncalves, P. (2009) Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. *FEMS Yeast Res* **9**: 511–525.
- Leandro, M.J., Sychrova, H., Prista, C., and Loureiro-Dias, M.C. (2013) ZrFsy1, a high-affinity fructose/H⁺ symporter from fructophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *PLoS ONE* **8**: e68165.
- Leandro, M.J., Cabral, S., Prista, C., Loureiro-Dias, M.C., and Sychrova, H. (2014) The high-capacity specific fructose facilitator ZrFz1 is essential for the fructophilic behavior of *Zygosaccharomyces rouxii* CBS 732^T. *Eukaryot Cell* **13**: 1371–1379.
- Liu, X., Mortensen, U.H., and Workman, M. (2013) Expression and functional studies of genes involved in transport and metabolism of glycerol in *Pachysolen tannophilus*. *Microb Cell Fact* **12**: 27.
- Loureiro-Dias, M.C., and Peinado, J.M. (1984) Transport of maltose in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of pH and potassium ions. *Biochem J* **222**: 293–298.
- Lucas, C., Dacosta, M., and Van Uden, N. (1990) Osmoregulatory active sodium-glycerol cotransport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **6**: 187–191.
- Maresova, L., and Sychrova, H. (2007) Applications of a microplate reader in yeast physiology research. *Biotechniques* **43**: 667–672.
- Maresova, L., Hoskova, B., Urbankova, E., Chaloupka, R., and Sychrova, H. (2010) New applications of pHluorin-measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast* **27**: 317–325.
- Martorell, P., Stratford, M., Steels, H., Fernandez-Espinar, M.T., and Querol, A. (2007) Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *Int J Food Microbiol* **114**: 234–242.
- Miesenbock, G., De Angelis, D.A., and Rothman, J.E. (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**: 192–195.
- Nelissen, B., De Wachter, R., and Goffeau, A. (1997) Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 113–134.
- Neves, L., Lages, F., and Lucas, C. (2004) New insights on glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **565**: 160–162.
- Onishi, H. (1963) Osmophilic yeasts. *Adv Food Res* **12**: 53–94.
- Orij, R., Postmus, J., Ter Beek, A., Brul, S., and Smits, G.J. (2009) *In vivo* measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiol* **155**: 268–278.
- Ozcan, S., Dover, J., Rosenwald, A.G., Wolfl, S., and Johnston, M. (1996) Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12428–12432.
- Pahlman, A.K., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S., and Adler, L. (2001) The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem* **276**: 3555–3563.
- Palma, M., Goffeau, A., Spencer-Martins, I., and Baret, P.V. (2007) A phylogenetic analysis of the sugar porters in hemiascomycetous yeasts. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**: 241–248.
- Pereira, I., Madeira, A., Prista, C., Loureiro-Dias, M.C., and Leandro, M.J. (2014) Characterization of new polyol/H⁺ symporters in *Debaryomyces hansenii*. *PLoS ONE* **9**: e88180.
- Perfect, J.R., Rude, T.H., Wong, B., Flynn, T., Chaturvedi, V., and Niehaus, W. (1996) Identification of a *Cryptococcus neoformans* gene that directs expression of the cryptic *Saccharomyces cerevisiae* mannitol dehydrogenase gene. *J Bacteriol* **178**: 5257–5262.
- Pribylova, L., and Sychrova, H. (2003) Efficient transformation of the osmotolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* by electroporation. *J Microbiol Methods* **55**: 481–484.
- Pribylova, L., de Montigny, J., and Sychrova, H. (2007a) Osmoresistant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: the two most studied wild-type strains (ATCC 2623 and ATCC 42981) differ in osmotolerance and glycerol metabolism. *Yeast* **24**: 171–180.
- Pribylova, L., de Montigny, J., and Sychrova, H. (2007b) Tools for the genetic manipulation of *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEMS Yeast Res* **7**: 1285–1294.
- Pribylova, L., Straub, M.L., Sychrova, H., and de Montigny, J. (2007c) Characterisation of *Zygosaccharomyces rouxii* centromeres and construction of first *Z. rouxii* centromeric vectors. *Chromosome Res* **15**: 439–445.
- Proft, M., and Struhl, K. (2004) MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118**: 351–361.
- Quain, D.E., and Boulton, C.A. (1987) Growth and metabolism of mannitol by strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **133**: 1675–1684.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M., and Hohmann, S. (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* **275**: 8290–8300.
- Roberts, G.G., and Hudson, A.P. (2006) Transcriptome profiling of *Saccharomyces cerevisiae* during a transition from fermentative to glycerol-based respiratory growth reveals

- extensive metabolic and structural remodeling. *Mol Genet Genomics* **276**: 170–186.
- Saito, H., and Posas, F. (2012) Response to hyperosmotic stress. *Genetics* **192**: 289–318.
- Serrano, R. (1983) *In vivo* glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett* **156**: 11–14.
- Sherman, D.J., Martin, T., Nikolski, M., Cayla, C., Souciet, J.L., Durrens, P., and Consortium, G. (2009) Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acids Res* **37**: D550–D554.
- Silva-Garca, M., and Lucas, C. (2003) Physiological studies on long-term adaptation to salt stress in the extremely halotolerant yeast *Candida versatilis* CBS 4019 (syn. *C. halophila*). *FEMS Yeast Res* **3**: 247–260.
- Silva-Graca, M., Neves, L., and Lucas, C. (2003) Outlines for the definition of halotolerance/halophily in yeasts: *Candida versatilis* (halophila) CBS 4019 as the archetype? *FEMS Yeast Res* **3**: 347–362.
- Solieri, L., Landi, S., De Vero, L., and Giudici, P. (2006) Molecular assessment of indigenous yeast population from traditional balsamic vinegar. *J Appl Microbiol* **101**: 63–71.
- Stribny, J., Kinclova-Zimmermannova, O., and Sychrova, H. (2012) Potassium supply and homeostasis in the osmotolerant non-conventional yeasts *Zygosaccharomyces rouxii* differ from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **58**: 255–264.
- Tamas, M.J., Luyten, K., Sutherland, F.C., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., *et al.* (1999) Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol Microbiol* **31**: 1087–1104.
- Tang, X.M., Kayingo, G., and Prior, B.A. (2005) Functional analysis of the *Zygosaccharomyces rouxii* Fps1p homologue. *Yeast* **22**: 571–581.
- Vandijken, J.P., and Scheffers, W.A. (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol Lett* **32**: 199–224.
- Yamanishi, M., Katahira, S., and Matsuyama, T. (2011) *TPS1* terminator increases mRNA and protein yield in a *Saccharomyces cerevisiae* expression system. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 2234–2236.
- Yancey, P.H. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* **208**: 2819–2830.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., and Somero, G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214–1222.
- Zhao, S., Douglas, N.W., Heine, M.J., Williams, G.M., Winther-Larsen, H.C., and Meaden, P.G. (1994) The *STL1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is predicted to encode a sugar transporter-like protein. *Gene* **146**: 215–219.
- van Zyl, P.J., and Prior, B.A. (1990) Water relations of polyol accumulation by *Zygosaccharomyces rouxii* in continuous culture. *Appl Microbiol Biot* **33**: 12–17.
- van Zyl, P.J., Kilian, S.G., and Prior, B.A. (1990) The role of an active-transport mechanism in glycerol accumulation during osmoregulation by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Appl Microbiol Biotechnol* **34**: 231–235.
- van Zyl, P.J., Prior, B.A., and Kilian, S.G. (1991) Regulation of glycerol metabolism in *Zygosaccharomyces rouxii* in response to osmotic stress. *Appl Microbiol Biot* **36**: 369–374.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Supplementary Information

Two glycerol uptake systems contribute to the high osmotolerance of *Zygosaccharomyces rouxii*

Michala Dušková¹, Célia Ferriera², Cândida Lucas², Hana Sychrová^{1*}

¹Department of Membrane Transport, Institute of Physiology Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

²Centre of Molecular and Environmental Biology (CBMA), Department of Biology, University of Minho, Braga, Portugal

*Correspondence to:
Hana Sychrová
Dept. Membrane Transport
Inst. Physiology AS CR
Videnska 1083
14220 Prague 4
Czech Republic.
E-mail sychrova@biomed.cas.cz

```

SACEOD16852g.aa -----
CAALBQ5A8J5.aa -----
ZYROOE01210g.aa -----
ZYROOE01188g.aa MAASSVSEKDIPPNRHTNGDLEKGLIESASSSRERYSTIAKKEDGNEKQTVGGETPPS 60

SACEOD16852g.aa -----MKDLKLSNFKGKFIKRTSHWGLTGKKLRYFITIA 34
CAALBQ5A8J5.aa -----MGGFIDNIFKRTTTAGLTGRKLRAAVTIT 29
ZYROOE01210g.aa -----MGKRTQGFMDYVFSRTSTAGLKGARLYTAAAV 33
ZYROOE01188g.aa SDSPVVRNGAESLPRDLPEGDSYDQLGFEPKGIKAYMFSRTAHAGARGLRLVLCSAT 120

TMD1 TMD2
SACEOD16852g.aa SMTGFSLFGYDQGLNASLITGKQFNVEFPATKENGDDHRAITVVGATTSCYELGCFAGS 94
CAALBQ5A8J5.aa ATLGFSLFGYDQGLNASLITGKQFNVEFPATKDN-----SVIQGAVTASYELGCFAGA 82
ZYROOE01210g.aa AVIGFALFGYDQGLNASLITGKQFNVEFPATKENGDDNDRYASVIQGAVTASYELGCFAGS 93
ZYROOE01188g.aa AVIAFLFGYDQGLNASLITGKQFNVEFPATKENGDDNDRYASVIQGAVTASYELGCFAGS 180

a TMD3 TMD4
SACEOD16852g.aa LFMVFCGRIGRPLILMGSVITIIIGAVISTCAFRGYWALGQFIIRVVTVGTGLNTST 154
CAALBQ5A8J5.aa IFALLRGHIALGRKPIIFFGATIIILGTIISVTPFRPHWPLGQFVVGRVITGIGNGHNTAT 142
ZYROOE01210g.aa LFMVFCGRIGRPLILMGSVITIIIGAVISTCAFRGYWALGQFVVGRVITGIGNGHNTAT 153
ZYROOE01188g.aa LFMVFCGRIGRPLILMGSVITIIIGAVISTCAFRGYWALGQFVVGRVITGIGNGHNTAT 240

b TMD5 TMD6
SACEOD16852g.aa IPVWQSEMSKAENRGLLVNLEGSTIAFGTHIAYWIDFGLSYTNSVQWRFPVSHQIVFAL 214
CAALBQ5A8J5.aa IPVWQSEMSKPNRGLLVNLEGSTIAFGTHIAYWIDFGLSYTNSVQWRFPVSHQIVFAL 202
ZYROOE01210g.aa IPVWQSEMSKPNRGLLVNLEGSTIAFGTHIAYWIDFGLSYTNSVQWRFPVSHQIVFAL 213
ZYROOE01188g.aa IPVWQSEMSKPNRGLLVNLEGSTIAFGTHIAYWIDFGLSYTNSVQWRFPVSHQIVFAL 300

c TMD7 d
SACEOD16852g.aa FLLAFNHIKIPESPRULISQSRTEEARYLVGLTDDADPNDEEVITEVANLHDAVNRTKHEK 274
CAALBQ5A8J5.aa WVIFGIIQIPESPRULISKDRKPEAFVLAALNDTTPDDDAIVAEASVIIDAVRNNAKVQ 262
ZYROOE01210g.aa VLLFGIVRIPESPRULIAKKRPAEARYVLACLDLPENDDAILENTSLHEAVNRSSNQK 273
ZYROOE01188g.aa VLLFGIIQIPESPRULIGQKRVQEAQYILACLDNDSCMDDEIVAEVTHLIDTARRFENKK 360

SACEOD16852g.aa HSLSSLFSRGRSQNLQRILIAASTOFFQOFTGCNAAIYYSIVLFIKTIKLD--YRLSMII 332
CAALBQ5A8J5.aa AGFKDLFTGGKTAHFQRIIGSSTOFFQOFTGCNAAIYYSIVLFIKTIKLD--YRLSMII 322
ZYROOE01210g.aa SQMKSLFSMGKQGNFSRIIGSSTOFFQOFTGCNAAIYYSIVLFIKTIKLD--YRLSMII 331
ZYROOE01188g.aa RSIKDLLTNGKTONNRRILIAASTOFFQOFTGCNAAIYYSIVLFIKTIKLD--YRLSMII 418

TMD8 TMD9
SACEOD16852g.aa GGVFATIVALTSTIGSFLLIEKLGRRLFLLGATGQAVSFITFACLVRNKENARGAAVG 392
CAALBQ5A8J5.aa GGVFATIVALTSTIGSFLLIEKLGRRLFLLGATGQAVSFITFACLVRNKENARGAAVG 382
ZYROOE01210g.aa GGVFATIVALTSTIGSFLLIEKLGRRLFLLGATGQAVSFITFACLVRNKENARGAAVG 391
ZYROOE01188g.aa GGVFATIVALTSTIGSFLLIEKLGRRLFLLGATGQAVSFITFACLVRNKENARGAAVG 478

TMD10 TMD11
SACEOD16852g.aa LFLFITFFGLSLSLPWIYPPPIASMKVRASTNAFSTCTNMLCNFAVVMHFTPIFIGQSGW 452
CAALBQ5A8J5.aa IYLFIVFFAFTILPLPWIYPPPIASMKVRASTNAFSTCTNMLCNFAVVMHFTPIFIGQSGW 442
ZYROOE01210g.aa LYLFIICFGLAILELPLPWIYPPPIASMKVRASTNAFSTCTNMLCNFAVVMHFTPIFIGQSGW 451
ZYROOE01188g.aa LFLFITFFGLSLSLPWIYPPPIASMKVRASTNAFSTCTNMLCNFAVVMHFTPIFIGQSGW 538

TMD12 e
SACEOD16852g.aa GCYLFFAVNNYLYIPVIFFFIPETAGRSLEIIDIIFAKAYEDGTQPVURVANHLPKLSLQE 512
CAALBQ5A8J5.aa GCYLFFAVNNYLYIPVIFFFIPETAGRSLEIIDIIFAKAYEDGTQPVURVANHLPKLSLQE 502
ZYROOE01210g.aa GCYLFFAVNNYLYIPVIFFFIPETAGRSLEIIDIIFAKAYEDGTQPVURVANHLPKLSLQE 511
ZYROOE01188g.aa GTYFFALNNYLYIPVIFFFIPETAGRSLEIIDIIFAKAYEDGTQPVURVANHLPKLSLQE 598

SACEOD16852g.aa VEDHANALGSYDDENEKEDFGEDRVEDTYNQINGDNSSS-----SSNIKN 557
CAALBQ5A8J5.aa VEDESKSLGLYDDDFEKNDF--ETKEDVS---DGTASNS-----NGVFEK 542
ZYROOE01210g.aa VEDYSQSLGLHDDENEKEEYDEKAEANAALFQVETSSKSPSSNRKDDAPIEHNEVQES 571
ZYROOE01188g.aa VEDYSQSLGLYDDENEKEEYDEKAEANAALFQVETSSKSPSSNRKDDAPIEHNEVQES 644

SACEOD16852g.aa EDTVNDKANFEG----- 569
CAALBQ5A8J5.aa PENV----- 546
ZYROOE01210g.aa NDNSNSNSNVEAPIVHHNDP 592
ZYROOE01188g.aa RESERAPHA----- 653

```

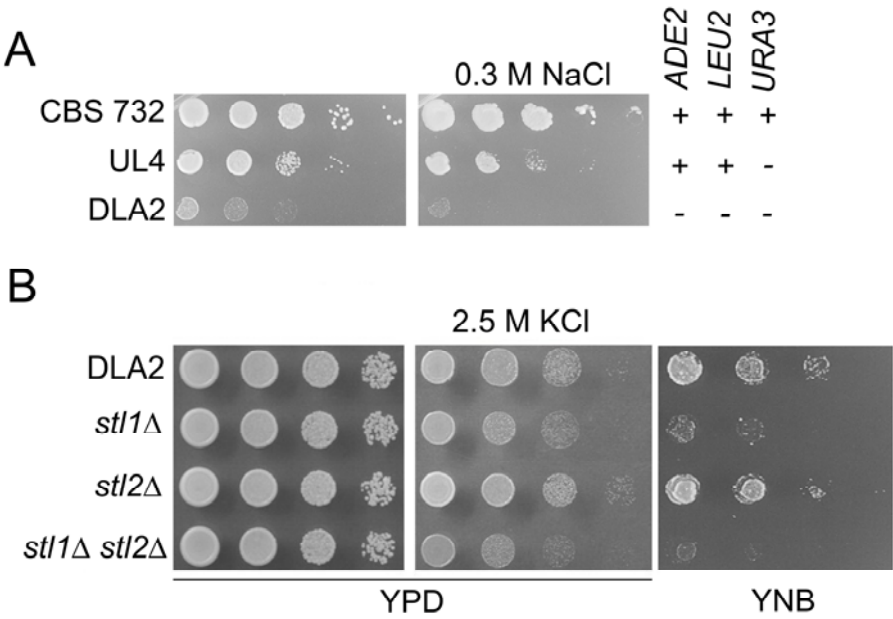
23

24 **Supplementary Figure S1.** Sequence alignment of Stl proteins from *S. cerevisiae* S288C
25 (SACE0D16852g), *C. albicans* SC5314 (CAALBQ5A8J5) and *Z. rouxii* CBS732
26 (ZYROOE01210g – ZrStl1, ZYROOE01188g – ZrStl2). The alignment was done using the web-
27 server based alignment program ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).
28 Predicted transmembrane domains are highlighted with shadowed boxes (numbered TMD1 -

29 TMD12), open boxes represent the conserved regions of the sugar-transporter family (marked a-
30 e) (Leandro *et al.*, 2009).

31

32



33

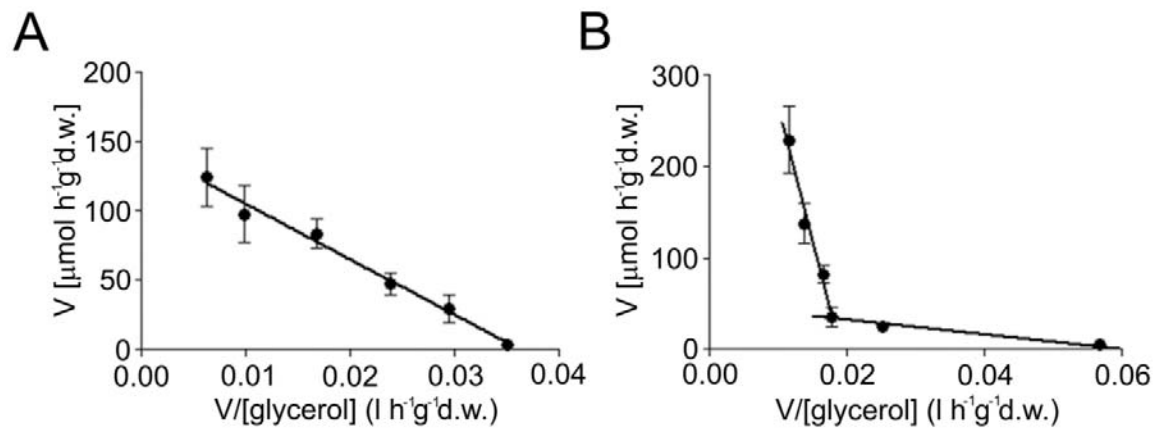
34 **Supplementary Figure S2.**

35 A. Growth of the *Z. rouxii* wild-type CBS 732, UL4 and DLA2 strains on solid YPD and YPD
36 supplemented with 0.3 M NaCl.

37 B. Growth of *stl* mutants derived from *Z. rouxii* DLA2 on solid YNB or YPD media with and
38 without 2.5 M KCl.

39

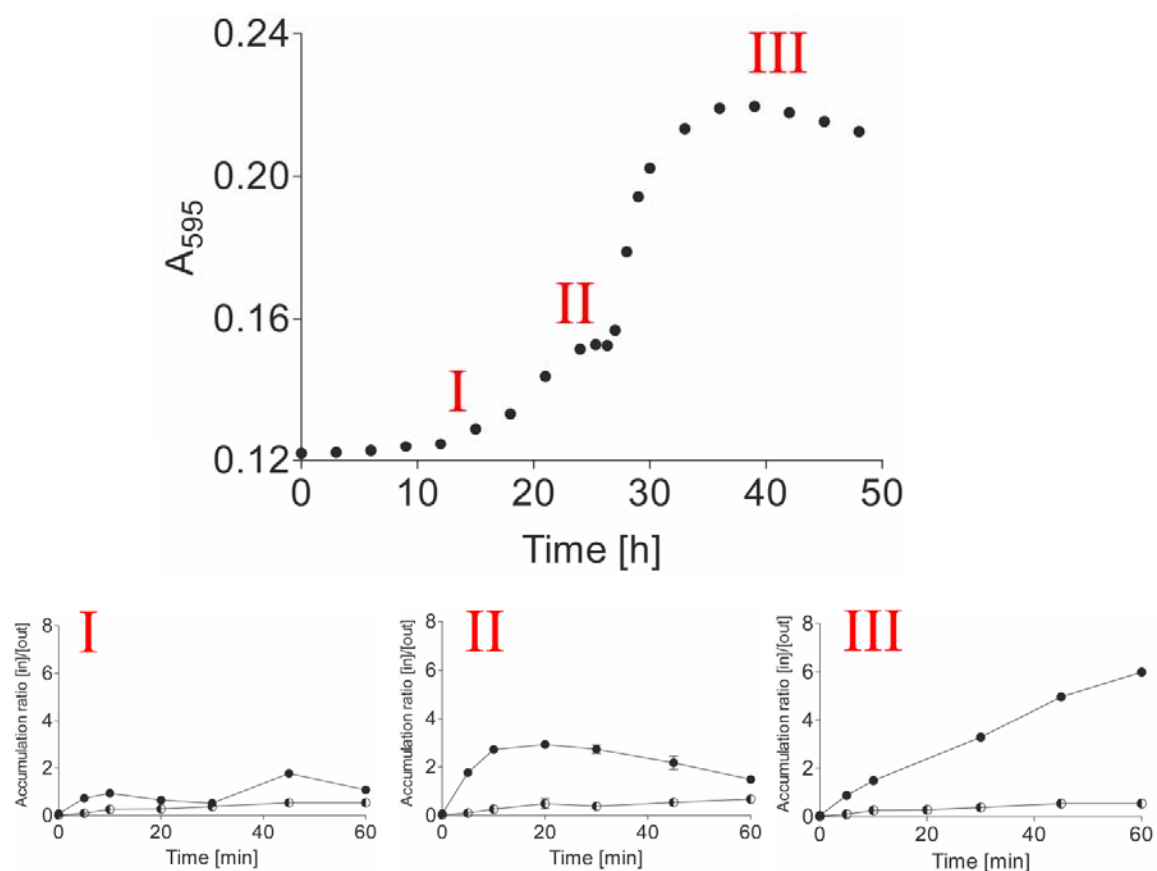
40



Supplementary Figure S3. Eadie-Hofstee plots of initial uptake rates of ¹⁴C-glycerol at pH 5.0 in *Z. rouxii* strains pre-grown in YPD.

A. MS1 (*stl1*Δ)

B. MS2 (*stl2*Δ)



Supplementary Figure S4. Accumulation of glycerol during the growth of *Z. rouxii* UL4 in YP media supplemented with 50 % sucrose. Upper panel, three phases of the growth curve. Lower panel, accumulation of ¹⁴C-glycerol in the three growth phases. As a negative control, 50 μM CCCP was added into the reaction at the beginning of the assay (semi-opened symbols).

64 **Supplementary Table S1.** Plasmids used in this study

Plasmid	Features	Reference
pZEU	<i>ScURA3</i> , pSR1, Amp ^R , ori	Pribylova <i>et al.</i> (2007a)
pZCA	<i>ScURA3</i> , ZrCEN A, Amp ^R	Pribylova <i>et al.</i> (2007b)
pZGFP	<i>GFP</i> , <i>ScURA3</i> , Amp ^R , ori	Pribylova <i>et al.</i> (2007a)
YEpl352	<i>ScURA3</i> , 2μ, Amp ^R , ori	Hill <i>et al.</i> (1986)
YEpl352-ZrSTL1	<i>ScURA3</i> , 2μ, Amp ^R , ori, <i>NHA1^P</i> -ZrSTL1	M. Duskova, unpublished
YEpl352-ZrSTL2	<i>ScURA3</i> , 2μ, Amp ^R , ori, <i>NHA1^P</i> -ZrSTL2	M. Duskova, unpublished
YEpl352-ScSTL1	<i>ScURA3</i> , 2μ, Amp ^R , ori, <i>NHA1^P</i> -ScSTL1	M. Duskova, unpublished
pUG6	<i>loxP</i> -TEF2 ^P -kanMX-TEF2 ^T - <i>loxP</i> , Amp ^R , ori	Guldener <i>et al.</i> (1996)
pZCRE	<i>ScGAL1^P</i> -CRE, <i>ScURA3</i> , pSR1, Amp ^R , ori	Pribylova <i>et al.</i> (2007a)
pZpH	<i>ADHI^P</i> -pHluorin, <i>ScURA3</i> , pSR1, Amp ^R , ori,	Stribny <i>et al.</i> (2012)
pHl-U	<i>ADHI^P</i> -pHluorin, <i>ScURA3</i> , 2μ, Amp ^R , ori	Maresova <i>et al.</i> (2010)
pVT100-U	<i>ScURA3</i> , 2μ, Amp ^R , ori	Vernet <i>et al.</i> (1987)
pZCA-ZrSTL1	Derived from pZCA, ZrSTL1 ^P -ZrSTL1	This study
pZCA-ZrSTL2	Derived from pZCA, ZrSTL2 ^P -ZrSTL2	This study
pZGFP-ZrSTL1	Derived from pZGFP, ZrSTL1 ^P -ZrSTL1	This study
pZGFP-ZrSTL2	Derived from pZGFP, ZrSTL2 ^P -ZrSTL2	This study

^P, promoter; ^T, terminator

65

66

67 **Supplementary Table S2.** Primers used in this study (5′- 3′)

Name	Sequence
Gene deletion	
<i>ZrSTL1</i> -kanR	AAAATACAACAAAACAAAAAGAGGAATTAGATCGTTATAATTTCGGA TAATCAAAAGGCATTATTATTATTATTATCATGAgcataggccgctagtggactg
<i>ZrSTL1</i> -kanF	ATATATACAAATAGTAAAAGTAAGAACCCACCCGTTACTTATCTGCT ATTCAATAACTTTTAATAACGTTAACAGAGACAttcgtacgctgcaggtcgac
<i>ZrSTL2</i> -kanR	AATCCCTGATTGTCTCAGCTGCACGCCTTGCAGTTCAGACAAAAAAG AGAAAAGGGTAAGCATTAAAAGTGAAGTAAAGAgcataggccgctagtggactg
<i>ZrSTL2</i> -kanF	AATTGCTTCCTACTTAAGTCTCCATCTCGAAAGGACAAGCTTAGTGAT TCAGCCAAAGACATAGGACATAATCAAGTGCTttcgtacgctgcaggtcgac
Diagnostic primers	
<i>ZrSTL1</i> -304up-F	CTATGGCGGGTAGGTTCTCC
<i>ZrSTL1</i> -290in2-F	CATGGATGGTTGCTCATCG
<i>ZrSTL1</i> -227in1-R	ACACTAGCATAACGATCATTATCAC
<i>ZrSTL1</i> -307down-R	AAGAAGAGGACGAAGGACAG
<i>ZrSTL2</i> -342up-F	CACAAACACACAGGGTTCGCT
<i>ZrSTL2</i> -211in2-F	TTGGAGAGTTGCCGCCAAGT
<i>ZrSTL2</i> -365in1-R	ACAGCAGTAGCCGAACAAAGAAC
<i>ZrSTL2</i> -147down-R2	TTTGTCTTCGTTTCTCGTG
pZEU-1F	GCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCC
pZEU-1R	CCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGC
<i>ZrSTL1</i> -405PROM-R	CCCCACTGAGAAGTTTGAATG
<i>ZrSTL2</i> -304PROM-R	CTTTCAATTGTTCTGATGGTGG
kanMX-R1	CTCTGGCGCATCGGGC
kanMX-F1	CATTTGATGCTCGATGA
Plasmid construction	
pZGFP- <i>ZrSTL1</i> -R	gaataattcttcaccttttagacattttaataaagctccggagAGGATCGTTATGATGTACTGG
pZGFP- <i>ZrSTL2</i> -R	gaataattcttcaccttttagacattttaataaagctccggagAGCGTGAGGAGCCCGCTCAGA
pZEU- <i>ZrSTL1</i> -R	gcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaattTAATTTCGGATAATCAAAAGG CAT
pZEU- <i>ZrSTL2</i> -R	gcaggtcgactctagaggatccccgggtaccgagctcgaattCTGCACGCCTTGCAGTTCAGA C
pZ- <i>ZrSTL1</i> -2kbup-F	gttttccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtggaattCAACAACTTTGAAAAGGTCTC GTAC
pZ- <i>ZrSTL2</i> -2kbup-F	gttttccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtggaattCTTTTAGCCGATTTTTCACAA TGCCCC

DNA sequences complementary to the sequences of *kanMX* gene and sequences of plasmids are shown in lower-case letters.

68

69

70 **Supplementary Table S3.** Accession numbers of Stl proteins analyzed in Fig. 9.

Name	Acc. number	aa	%	Name	Acc. number	aa	%
SACE0D16852g	NP_010825	569	100	CD36_64300	XP_002421142	546	60
ZYRO0E01188p	XP_002498998	653	59	Cd36_70500	XP_002421270	546	38
ZYRO0E01210p	XP_002498999	592	63	CLUG_03661	XP_002616420	552	37
DEHA2A12364p	XP_456868	552	39	CLUG_01020.1	XP_002619861	549	63
DEHA2B05060g	XP_457182	549	59	PISO0A00352g	XP_004204749	572	60
DEHA2B12958g	XP_457508	561	37	PISO0B00419g	XP_004204191	571	59
DEHA2E00792g	XP_459363	510	38	PISO0C00222g	XP_004203599	520	23
DEHA2E01364g	XP_459386	562	57	PISO0D00289g	XP_004203016	520	24
DEHA2E01386g	XP_459387	549	62	PISO0H08939g	XP_004200688	623	28
DEHA2F00572g	XP_460384	544	57	PISO0K03046g	XP_004197618	643	28
DEHA2F01012g	XP_460405	494	36	PISO0L03047g	XP_004196587	643	28
KLLA0A03223g	XP_451141	678	30	PISO0M10748g	XP_004195829	590	36
KLLA0F26246g	XP_456249	583	69	PISO0N11035g	XP_004194737	589	36
KLTH0B04510g	XP_002551983	568	67	YALI0A08998g	XP_499889	576	37
SAKL0G18810g	SAKL0G18810g	572	61	YALI0C16522g	XP_501907	578	38
CAALBQ5A8J5	XP_718089	546	61	YALI0D01111g	XP_502271	592	38
CAALBorf.7093	XP_888663	485	38	YALI0F06776g	XP_505095	532	31
CPAR2_301390	CCE41150	563	37	PATAJQ481633	M4H381	575	35
CPAR2_600450	CCE39632	567	58	PATAJQ481634	M4H3P8	634	28
CORT_0H01390	XP_003871377	563	37	DEBR_JX965362 1	JX965362	598	54
CORT_0H02360	XP_003871470	487	62	DEBR_AHMD010001 00	AHMD010001 00	611	52
PGUG_00806	XP_001487429	632	35	LELG_04949.1	XP_001524136	572	61
PGUG_04006.1	XP_001483277	564	61	LELG_05548	XP_001523322	559	36
CTRG_05416	XP_002551118	542	62	ERGO0D12584g	NP_984235	558	68
CTRG_05662	XP_002551364	320	36	CAGL0A02321g	XP_444865	557	23

71 %, identities relative to *S. cerevisiae* ScStl1p. aa, length of protein expressed in number of amino
72 acids.

73

74

75

76 **Supplementary References:**

- 77 Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J.H. (1996) A new efficient
78 gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519-
79 2524.
- 80 Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. and Tzagoloff, A. (1986) Yeast *Escherichia coli* shuttle
81 vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**: 163-167.
- 82 Leandro, M.J., Fonseca, C. and Goncalves, P. (2009) Hexose and pentose transport in
83 ascomycetous yeasts: an overview. *FEMS Yeast Res* **9**: 511-525.
- 84 Maresova, L., Hoskova, B., Urbankova, E., Chaloupka, R. and Sychrova, H. (2010) New
85 applications of pHluorin-measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and
86 determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium
87 homeostasis. *Yeast* **27**: 317-325.
- 88 Pribylova, L., de Montigny, J. and Sychrova, H. (2007a) Tools for the genetic manipulation of
89 *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEMS Yeast Res* **7**: 1285-1294.
- 90 Pribylova, L., Straub, M.L., Sychrova, H. and de Montigny, J. (2007b) Characterisation of
91 *Zygosaccharomyces rouxii* centromeres and construction of first *Z.rouxii* centromeric
92 vectors. *Chromosome Res* **15**: 439-445.
- 93 Stribny, J., Kinclova-Zimmermannova, O. and Sychrova, H. (2012) Potassium supply and
94 homeostasis in the osmotolerant non-conventional yeasts *Zygosaccharomyces rouxii*
95 differ from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **58**: 255-264.
- 96 Vernet, T., Dignard, D. and Thomas, D.Y. (1987) A family of yeast expression vectors
97 containing the phage-F1 intergenic region. *Gene* **52**: 225-233.

98

4.4 Rukopis č. 1 - The glycerol transporter from *Zygosaccharomyces rouxii* improves the fitness of *Saccharomyces cerevisiae* assimilating mannitol.

Manitol jako vícesytný cukerný alkohol plní v mnoha organismech úlohu tzv. vnitřního osmolytu. Nejedná se pouze o kvasinky, kde je za tímto účelem syntetizován, ale především o vyšší rostliny a také řasy. Díky jeho vysokému zastoupení v hnědých mořských řasách (až 33 % suché váhy) se dostává do popředí zájmu coby významný prekursor se zajímavým biotechnologickým využitím. Nejtradičnější je jeho přeměna na bioetanol pomocí bakteriálních kmenů. K tomuto procesu se však stále častěji začínají využívat některé druhy kvasinek, a to především díky jejich odolnosti k vysokým koncentracím etanolu, na rozdíl od doposud využívaných bakterií.

Hlavním cílem této práce bylo zlepšení vlastností laboratorních *S. cerevisiae* expresí genu kódujícího glycerolový přenašeč *ZrStl1* v kvasince *Z. rouxii*. Získané výsledky mohou být následně snadno aplikovány v průmyslově využívaných kvasinkových kmenech. Výsledky této práce vycházejí z dat získaných v publikaci č. 2 a č. 3 (kapitoly 4.2 a 4.3), kdy bylo zjištěno, že 1) manitol hraje významnou úlohu v metabolismu glycerolu jak kvasinky *Z. rouxii*, tak konvenční *S. cerevisiae*, 2) exprese *ZrSTL1* je významně zvýšena v přítomnosti manitolu a 3) funkce *ScStl1* není jeho přítomností nijak negativně ovlivňována.

V rámci této práce bylo zjištěno, že čtyři z pěti testovaných běžně laboratorně využívaných kmenů *S. cerevisiae* rostou na manitolu jako zdroji uhlíku a nebude tedy příliš obtížné nalézt průmyslový kmen vhodný k přeměně manitolu na etanol, což se předpokládalo v dosud publikovaných studiích (Chujo *et al.*, 2015).

Heterologní exprese genu *ZrSTL1* v buňkách *S. cerevisiae* výrazně zlepšila růst nejen osmosenzitivních kmenů postrádajících vlastní *ScSTL1*, ale současně také růst kmenů W303 a BY4741 se zcela nepoškozeným transportem glycerolu. K expresi byly využity plasmidy se slabým konstitutivním promotorem a současně také integrace do genomu buněk *S. cerevisiae*. Tímto komplexním přístupem byla nastíněna možná regulace exprese v případě průmyslového využití. Získané výsledky dále vyvracejí, že by byl glycerol do buněk transportován pomocí cukerných přenašečů *ScHxt*, jak bylo dříve publikováno (Chujo *et al.*, 2015). Hlavním závěrem této práce je, že heterologní exprese genu *ZrSTL1* může významně vylepšit průmyslově využívané kmeny *S. cerevisiae* asimilující manitol a zdokonalit tak systém pro přeměnu manitolu na bioetanol.

Dušková, M., C. Lucas, & H. Sychrová, (rukopis) The glycerol transporter from *Zygosaccharomycetes rouxii* improves the fitness of *Saccharomyces cerevisiae* assimilating mannitol.

The glycerol transporter from *Zygosaccharomyces rouxii* improves the fitness of *Saccharomyces cerevisiae* assimilating mannitol

Michala Dušková^{1,2}, Cândida Lucas³, Hana Sychrová^{1*}

¹Department of Membrane Transport, Institute of Physiology, The Czech Academy of Sciences, v.v.i., Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

³Centre of Molecular and Environmental Biology (CBMA), Department of Biology, University of Minho, Braga, Portugal

*Correspondence to:

Hana Sychrova, Department of Membrane Transport, Institute of Physiology CAS, Videnska 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic.

E-mail: zychrova@biomed.cas.cz; Tel: + 420 241066556; Fax: + 420 241062488

Keywords: mannitol, glycerol transport, *Zygosaccharomyces rouxii*, Stt1, bioethanol

ABSTRACT

Mannitol is a sugar alcohol playing role of internal osmolyte in many organisms, such as seaweeds where is present in a very high concentration (up to 33 % of dry weight). This high natural occurrence makes mannitol promising carbon source in biotechnologies, especially in production of bioethanol. Some bacteria and yeast strains are traditionally used for conversion of mannitol into bioethanol. On the contrary to bacteria, yeasts are highly resistant to ethanol and some other growth-inhibitory compounds which are inseparably connected with bioethanol production. One of the mechanisms which allows yeasts to survive high ethanol concentration is production and retention of glycerol. *Zygosaccharomyces rouxii* possesses two very efficient glycerol transporters (*ZrStl1* and *ZrStl2*) mediating the uptake of glycerol from surrounding. These transporters help cells to overcome the unfavourable conditions such as hyperosmotic stress or high ethanol concentration. Our data indicate that *ZrSTL1* can be functionally expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and so improve the growth of cells even upon non-stress conditions. We also found that the best way of heterologous expression is integration of *ZrSTL1* gene with suitable terminator (e.g. *ScTPS1*) into the genome of *S. cerevisiae*. The addition of another Stl1 transporter, besides *ScStl1*, very significantly improved fitness, growth and osmotolerance of cells tested on mannitol as a carbon source. This study will be highly beneficial for improvement of industrial strains of *S. cerevisiae* employed in production of bioethanol from mannitol.

INTRODUCTION

The use of yeasts as the producers of different compounds or biocatalysts is now in the ascendant, but each industrial process is unavoidably connected with stress conditions, especially hyperosmotic conditions. The responses to these stresses differ species by species, according to their physiological disposition. Some species are more tolerant and other less, but chiefly the more osmotolerant yeasts are used in industrial processes. Among the osmotolerant yeast species is counted also the non-conventional yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Z. rouxii* is closely related to conventional *Saccharomyces cerevisiae* (1), but is endowed with rather unusual physiological properties such as the mentioned osmotolerance, resistance to weak acids or high temperature, which are largely responsible for its broad use in food industry as well as the ability to cause spoilage (2, 3). In view of this, the most frequent habitat of *Z. rouxii* is the environment with high salt or sugar concentration and low pH such as fruit juices, syrups, dressings, ketchup or some sweat sauces (4, 5).

The exact mechanism of *Z. rouxii* osmotolerance has been intensively studied, but still is not fully known. Generally speaking, the level of osmotolerance is going hand in hand with metabolism of glycerol (6), and it is presumed that the situation in *Z. rouxii* will be similar (7, 8). This small and uncharged molecule is synthesized in cytosol from glycolytic intermediate dihydroxyacetone-P and is used by majority of species as the main compatible solute, including *Z. rouxii* (3). Glycerol is produced as a by-product of metabolism and its synthesis is functionally increased in the response to hyperosmotic stress. The amount of intracellular glycerol is not influenced only by its synthesis, but also by its transport. *S. cerevisiae*, as well as *Z. rouxii* possess glycerol channel, named Fps1, which mediates the facilitated diffusion of glycerol and is closed during hyperosmotic conditions (9-14). Second transporter which is involved in glycerol homeostasis is known by the name Stl1 (abbreviated version of Sugar Transporter Like). It is glycerol-H⁺ symporter mediating the active uptake of glycerol (15). Besides *S. cerevisiae*, Stl1 was fully characterised only in *Candida albicans* (16) and recently by our group also in *Z. rouxii* (17). We have found and characterised two *ScSTL1* homologues in the genome of osmotolerant *Z. rouxii* CBS 732^T, *ZrSTL1* and *ZrSTL2* (17). Our data indicate that both genes encode functional transporters mediating the uptake of glycerol in symport with H⁺ even in the presence of glucose, similarly as in *C. albicans*. In case of *S. cerevisiae*, the presence of glucose in the environment causes the repression and inactivation of *STL1*/Stl1 with subsequent internalisation of protein into vacuoles (15). We also found that both transporters from *Z. rouxii* are involved in pH homeostasis and on the contrary to *C.*

albicans or *S. cerevisiae*, they influence the fitness of *Z. rouxii* even upon non-stress conditions (17). Although both transporters impart similar properties to *Z. rouxii*, ZrStl1 plays more important role upon some specific conditions, especially when mannitol is used as a carbon source (higher expression; significant influence to intracellular pH; growth rate). On the other hand, according acquired expression data, ZrStl2 seems to be kind of “housekeeping” glycerol transporter in *Z. rouxii*.

The natural response of cells to hyperosmotic conditions is the glycerol synthesis, the prevention of glycerol release and its uptake from surrounding. But the energy consuming synthesis is much higher than the uptake. For instance, the production of biodiesel is accompanied by huge production of waste glycerol, around 10 % w/w (18). It involves big economic losses and investment in new technologies consuming this glycerol as a precursor for subsequent usage. The solution how to diminish the glycerol production and simultaneously increase the yield of required compounds is the genetic manipulation of industrial strains. Newly constructed strains should transport more glycerol inside the cells from the surrounding and raise so the internal osmolarity without need of its increased synthesis.

Not only the biodiesel is the required product of biotechnological manufacturing processes. Yeast are more frequently used for production of some other compounds, pharmaceuticals and bioethanol (19, 20). They are distinguished by efficient conversion of raw material (starch, lignocellulose, etc.) into the final products or rather into some precursors, which are subsequently metabolised. The usage of compounds, which are naturally occurring in plants, fruits etc. and can be easily converted into final products represents big simplification and price reduction of whole process. One of such compounds is mannitol. The biggest sources of this sugar alcohol are mainly brown seaweeds or manna (obtained by heating the bark of tree *Fraxinus ornus*) (21, 22). The yeast-algal bioethanol production system, which is able to convert mannitol into ethanol is currently in high demand. Generally speaking, *S. cerevisiae* is a good candidate for bioethanol production because of its resistance to high ethanol, to inhibitory compounds and existence of fully developed tools for genetic manipulation.

The results from our previous works (17, 23) together with recently published paper dealing with the possibility to convert mannitol from seaweeds to bioethanol by yeast (22), gave us the idea to study the influence of mannitol on yeast physiology. We observed that at least three routinely using laboratory strains *S. cerevisiae* (BY4741, W303-1A and CEN.PK-1C) and *Z. rouxii* UL4 are growing on mannitol as a source of carbon similarly as on glucose and that strains missing genes encoding glycerol transporters Stl1 displayed strong phenotype

on mannitol media, regardless of tested species (17, 23). Moreover, we have found that heterologous expression of glycerol transporter from *Z. rouxii* in these laboratory strains *S. cerevisiae* significantly improved their growth in presence of mannitol. The efficient uptake system helped cells to import lost glycerol and to invest saved energy in proliferation. Our study has huge biotechnological potential, because we are showing the possible way how to improve already existing cell factories, which produce redundant glycerol or how to develop completely new system utilising mannitol. The decreasing of glycerol production even in the order of units of percent would have immense benefit regard to worldwide production.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and plasmids

The yeast strains used in this study are listed in Table 1. All *S. cerevisiae* mutant strains are derivatives of W303-1A (24) and were constructed by homologous recombination using *CRE-loxP* with the *kanMX* marker gene (25) and the primers listed in Table S1. Plasmids used in this study are listed in Table 2. New episomal plasmids were constructed by homologous recombination in *S. cerevisiae* BW31a by insertion of *ZrSTL1*, *ZrSTL2* and *ScSTL1* into pNHA1-985 and pNHA1-985GFP. Genomic DNA of *Z. rouxii* ULA and *S. cerevisiae* W303-1A were used as a template for amplification of required fragments containing *ZrSTL1*, *ZrSTL2* and *ScSTL1*. The primers used for construction and the diagnosis of all plasmids are listed in Table S1.

The *kanMX* fragment and *ScTPS1* terminator (26) were inserted into newly constructed episomal vectors behind *STL* genes generating integrative plasmids YEp352-*ZrSTL1-TPS1^T-kanMX*, YEp352-*ZrSTL2-TPS1^T-kanMX* and YEp352-*ScSTL1-TPS1^T-kanMX*. Fragments containing *STL* genes, *ScTPS1^T* and *kanMX* were amplified by PCR and newly-emerged fragments were subsequently used for transformation of *S. cerevisiae* *fps1Δ* and *S. cerevisiae* *fps1Δ stl1Δ::ZrSTL1/ZrSTL2/ScSTL1* strains were generated. The proper incorporation into the IV chromosome behind *ScSTL1* promoter was verified by diagnostic PCR (Table S1). The diagnostic PCR together with sequencing were used for verification of all constructed plasmids.

Escherichia coli XL1-Blue (Stratagene) was routinely used as the host for plasmid amplification.

Growth media

Batch cultures were grown aerobically (30 °C, 160 rpm) in complex YPD (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % glucose), in YEPG (1 % yeast extract, 2 % peptone, 1 % ethanol, 1 % glycerol), YPM (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % mannitol), YPL (1 % yeast extract, 2 % peptone, 0.1 % lysine), minimal YNB medium (0.69 % YNB without amino acids (FormediumTM, UK)) with 2 % glucose (YNB-D), 2 % mannitol (YNB-M) or 0.1 % lysine (YNB-L) used as a source of carbon. Auxotrophic supplements BSM w/o uracil, BSM complete (Brand Supplement Mix, FormediumTM, UK) or G418 (900 µg/ml, FormediumTM, UK) were added after autoclaving. *Escherichia coli* transformants were grown in standard Luria-Bertani medium supplemented with ampiciline as a selection marker (100 µg/ml, Biotika.s., Slovakia).

Growth assays

The growth of yeast cells was monitored on solid and in liquid media. The growth rate measurements in liquid media were performed in 96-well plates according to (27). For drop tests on solid media, cells pre-grown on YPD or YNB-D plates at 30 °C for 48 hours were suspended in sterile water to $A_{600} = 2$. Serial fifteen-fold dilutions of cell suspensions were spotted on YPD, YPEG, YPM, YPL, YNB-D, YNB-M and YNB-L plates without or supplemented with salts (0.3 – 1 M NaCl, 0.4 – 1 M KCl) a 10 mM glycerol. The growth was monitored for 7 days. All experiments were performed at least twice and representative results are shown.

Glycerol uptake and accumulation

To estimate the initial rates of uptake of radiolabelled glycerol and the [in]/[out] accumulation ratios, we used the methods described earlier (17, 28). Cells grown in 100 ml of media (indicated in the text) were harvested in the mid-exponential growth phase ($A_{600} = 0.6$; $A_{600} = 0.4$ for cells grown in YNB-D w/o uracil), washed twice with ice-cold distilled water and resuspended to a final concentration of about 30 mg (dry weight)/ml in distilled water. To follow the initial uptake rates or glycerol accumulation, aqueous solutions of ¹⁴C-glycerol ([¹⁴C(U)] glycerol, ARC, Saint Louis, USA) with specific activities of 200 dpm/nmol were used.

Fluorescence microscopy

Yeast cells producing Stl proteins tagged with GFP at their C-terminus growing in YNB-D and YEPG were harvested at the exponential growth phase. The fluorescence signal was

observed under an *Olympus AX 70* microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) using a U-MWB cube with a 450 – 480 nm excitation filter and 515 nm barrier filter or under Nomarski contrast.

In silico analyses

The sequences of DNA and proteins were obtained from the Génolevures (29), SGD (30), GenBank (31) and CGD (32) databases. The multiple sequence alignment and comparative analyses were performed using the DNASTAR Lasergene 11 Core Suite (DNASTAR, Madison, WI, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

First of all we wanted to uncover which routinely using laboratory strains of *S. cerevisiae* are able to assimilate mannitol. Herein we tested the growth of five strains (W303-1A, BY4741, CEN.PK-1C, S288C and EBY VW.4000) on minimal media supplemented with 2 % glucose or 2 % mannitol (Fig. 1). Surprisingly, four of five tested strains had no problem to use mannitol as a source of carbon. Only one who did not grow was *S. cerevisiae* S288C. This finding was in agreement with previously published results by D. E. Quain and C. A. Boulton (33). We also wanted to know whether is mannitol transported into the cells via sugar transporters Hxt as described previously (22). The best strain to prove it was strain lacking all *HXT* genes, EBY VW.4000. Surprisingly, EBY VW.4000 grew on mannitol similarly as its parental strain CEN.PK-1C. It means that mannitol has to be transported into *S. cerevisiae* by some other transporter and not via Hxt10, Hxt13, Hxt15 and Hxt17 as published previously (22).

As mentioned above, glycerol transporters *ZrStl1* and *ZrStl2* have influence on many physiological parameters in *Z. rouxii*, including intracellular pH, growth upon normal and also upon stress growth conditions, survival of hypoosmotic stress, etc. (17). Based on results from our previous study, where we observed strong deterioration of growth of strains missing these glycerol transporters on media with mannitol (17), we decided to study their heterologous expression in *S. cerevisiae* utilising mannitol (mutants derived from *S. cerevisiae* W303-1A and BY4741). Although *Z. rouxii* is the carrier of two functional highly similar glycerol transporters (Table 4; approximately 67 % identity on protein level) the heterologous expression of *ZrStl2p* in *S. cerevisiae* was not successful (Fig. S1; (17)). Based on these results, the majority of our work is focused only on functional expression of *ZrSTL1*.

The two ways of heterologous expression of *ZrSTL1* in *S. cerevisiae* were used. First of them was the expression from episomal plasmids with weak constitutive *NHA1* promoter and the second approach involved their integration in *ScSTL1* locus of *S. cerevisiae fps1Δ*, behind *STL1* promoter. The complexity of these two approaches with using two types of promoters allowed us to uncover possible modifications of genes in case of industrially using strains and to compare the expression of *ZrSTL1* with expression of natural *ScSTL1*.

It is known that *ScSTL1* and subsequently the product of this gene (*ScStl1*) are repressed resp. inactivated by glucose (15). To exclude any type of gene repression, we placed *ScSTL1* and *ZrSTL1* genes behind constitutive *NHA1* promoter in the episomal plasmids. The potential inactivation was circumvented by using the mannitol, lysine or combination of ethanol and glycerol as the carbon source in majority of experiments.

Constructed episomal plasmids containing *STL* genes (listed in Table 2) were introduced into *S. cerevisiae* strain lacking *HOG1* and *STL1*, derived from W303 genetic backgrounds (*hog1Δ stl1Δ*, Table 1). The absence of *Stl1* transporter as well as *Hog1* kinase caused osmosensitivity and diminished growth of *S. cerevisiae* on media with higher concentration of salts (Figs. 2A – 2C, upper panels, cells with empty vector YEp352). We chose this osmosensitive genetic background to uncover potential influence of heterologous expression, which would be normally disguised. Cells carrying the empty vector YEp352 represented the system without glycerol uptake and were used as a negative control in this study.

To reveal the cellular localisation of *Stl1* proteins in *S. cerevisiae* upon chosen conditions, we linked *ScSTL1* and *ZrSTL1* genes with gene encoding the GFP in episomal plasmids derived from pNHA1-985GFP. The final proteins were tagged at their C-terminus. In spite of constitutive production of *ScStl1*, from Fig. 3 (left panel, 2 % glucose used as a source of carbon) is evident that majority of protein was localised in vacuoles of cells grown on glucose, which is in agreement with *ScStl1* inactivation by glucose (15). The non-fermentable carbon sources such as ethanol and glycerol did not have the same effect; fluorescent signal of *ScStl1*-GFP was detected in the periphery of *S. cerevisiae hog1Δ stl1Δ*. On the other hand, *ZrStl1*-GFP was localised in plasma membrane regardless of used carbon source (Fig. 3, middle panel). The localisation of control protein *ScNha1*, Na^+/H^+ antiporter involved in sodium and potassium efflux (34, 35), was according our presumption in the plasma membrane of *S. cerevisiae* regardless of used carbon source and served as a control of *NHA1* promoter (Fig. 3, right panel).

The contribution of both transporters to cells osmotolerance of *S. cerevisiae hog1Δ stl1Δ* was tested on minimal media with mannitol or lysine as carbon sources and added salt. Already

the addition of 0.3 M NaCl or 0.4 M KCl caused that none of tested strains were growing on used media (Figs. 2A and 2B, upper panels). But the addition of 10 mM glycerol resulted in restored growth of cells carrying *ScSTL1* or *ZrSTL1*. The functional uptake system together with available glycerol helped cells to overcome unfavourable conditions. Using of glycerol and ethanol as a source of carbon in Fig. 2C showed us similar results confirming that the presence of functional uptake system for glycerol is absolutely essential for growth of cells upon osmotic stress. The measurement of glycerol accumulation supported the fruitfulness of *ScSTL1* and *ZrSTL1* expression in *S. cerevisiae hog1Δ stl1Δ*. The presence of those two genes ensured eight times higher concentration of ¹⁴C-glycerol inside the cells in comparison with surrounding (Fig. 2D). The YEPG medium was used for these measurements. The depletion of proton motive force by addition 50 μM protonophore CCCP after 35 minutes of accumulation caused the immediate release of glycerol (Figs. S3A and S3B; opened symbols) and confirmed that the accumulation is dependent on proton motive force in both mentioned cases. No glycerol was accumulated when the CCCP was added at the beginning of the reaction (Supplementary Figs. 3A and 3B; semi-opened symbols).

One of the presumptions of meaningful heterologous expression of *ZrSTL1* and its subsequent application in mannitol conversion to bioethanol, should be the improved fitness of cells even upon non-stress conditions and in presence of mannitol as a carbon source. Therefore we tested the growth of *S. cerevisiae* BY4741 and derivative of W303-1A (both strains assimilate mannitol (Fig. 1)), carrying *ZrSTL1* on episomal plasmid (Fig. 4A). The empty vector as well as plasmid containing *ScSTL1* were used as controls. Both genetic backgrounds expressing *ZrSTL1* and *ScSTL1* displayed significantly better growth on YNM media with 10 mM glycerol in comparison with empty vector and cells without available glycerol. The same phenotype was observed in liquid media for both backgrounds, but only BY4741 is shown (Fig. 4B). This experiment also convinced us that the overexpression (increasing the copy number of *STL1* genes) was not toxic for cells and that the placement behind stronger promoter would be a proper improvement for industrial purposes.

Further, we employed the second approach in this study in order to reach stable expression of *ZrSTL1* without using selective media. For this purpose, *S. cerevisiae* with chromosomal integration of *ScSTL1* and *ZrSTL1* behind *ScSTL1* promoter in strain lacking Fps1 channel (*S. cerevisiae fps1Δ*) were constructed. Strains were generated by homologous recombination and genes were supplied with *TPS1* terminator. *S. cerevisiae* lacking both *ScFps1* and *ScStl1* was used as a negative control. On the other hand, strain after deletion of only *ScFps1* channel, i.e.

with functional natural unchanged version of *ScSTL1*, was used for comparison with newly constructed strains.

The growth tests confirmed that only cells with natural version of *ScSTL1* (*fps1Δ*) and reintegrated *ScSTL1* and *ZrSTL1* (*fps1Δ stl1::ScSTL1*, *fps1Δ stl1::ZrSTL1*) were able to grow on mannitol or lysine based media with high salt concentration and 10 mM glycerol (Fig. 5). These same strains also accumulated the glycerol against the concentration gradient when grown in YEPG media (Fig. 6A). Both mutants with reintegrated *STL* genes reached approximately 10 times higher intracellular concentration of glycerol in comparison with surrounding. The maximal accumulation ratio of *S. cerevisiae fps1Δ* was 6. The difference between *fps1Δ* and *fps1Δ stl1::ScSTL1* in efficiency of glycerol accumulation was caused by *TPS1* terminator, which was added behind *ScSTL1* gene and its role is to increase the amount of mRNA and subsequently protein during translation (26). The dependence of the accumulation on the proton motive force is evident from Figures S3C and S3D (opened symbols, semi-opened symbols), similarly as in case of expression of *STL1* genes from plasmids. The examination of growth on the same media as used for accumulation measurement, but supplemented with 1 M NaCl or 1 M KCl repeatedly showed that only cells with functional uptake system could proliferate when glycerol and ethanol were used as a source of carbon (Fig. 6B).

The influence of *TPS1* terminator was evident also from the comparison of V_{\max} and K_m of glycerol transport in *fps1Δ stl1Δ::ScSTL1* and previously published data made on W303 *fps1Δ* (36). Although the affinities for glycerol were pretty similar (3.0 mM published and 4.03 mM in our study), the capacity of transport (V_{\max}) was much higher in our study (221.5 $\mu\text{mol.h}^{-1}\text{g d.w.}^{-1}$ versus 653.0 $\mu\text{mol.h}^{-1}\text{g d.w.}^{-1}$ in our study) and V_{\max} reflects the amount of protein capable of transport. K_m and V_{\max} of glycerol transport *fps1Δ stl1Δ::ScSTL1* and *fps1Δ stl1Δ::ZrSTL1* are shown in Table 3. Data mentioned in Table 3 showed that *ZrStl1* is glycerol transporter with high affinity to glycerol, similarly as *ScStl1p*. The identical V_{\max} for *ZrStl1* and *ScStl1* assured us that both genes were produced in the same amount and quality although first mentioned protein originates from different organism. Figure 7 represents the Eadie-Hofstee plots of ^{14}C -glycerol initial uptake rates in *fps1Δstl1Δ::ScSTL1* (Fig. 7A) and *fps1Δstl1Δ::ZrSTL1* (Fig.7B).

CONCLUSION

In summary, our results showed that osmotolerant non-conventional yeast *Z. rouxii* is a carrier of two glycerol transporters, but only *ZrStl1* can be easily express in *S. cerevisiae*. Our data

also confirmed that *ZrStl1* transports glycerol in symport with H^+ as efficiently as *ScStl1* and that the presence of this protein very significantly improved the growth of *S. cerevisiae* strains even upon non-stress conditions. According obtained results, the chromosomal integration of another *STL* genes (besides *ScSTL1*) and addition of the suitable terminator, caused improved fitness, growth as well as the osmotolerance of tested cells on mannitol as a carbon source.

We venture to say that overexpression of *ZrSTL1* in industrially using *S. cerevisiae*, could bring higher yield of desired product with lower production of waste glycerol. The production of ethanol from mannitol, which is naturally contained in high level in brown seaweeds could be improved by employment *S. cerevisiae* overproducing *ZrStl1*. Our study also confirmed that is not such difficult to find suitable *S. cerevisiae* strain for this purpose.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the following grants: GA CR P503/10/0307, GA UK 299611/2011/B-Bio/PrF, an LLP ERASMUS practical placement grant and FCT/MEC through Portuguese funds (PIDDAC)-PEst-OE/BIA/UI4050/2014.

REFERENCES

1. **de Montigny J, Straub M, Potier S, Tekaia F, Dujon B, Wincker P, Artiguenave F, Souciet J.** 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 8. *Zygosaccharomyces rouxii*. FEBS Lett **487**:52-55.
2. **Solieri L, Landi S, De Vero L, Giudici P.** 2006. Molecular assessment of indigenous yeast population from traditional balsamic vinegar. J Appl Microbiol **101**:63-71.
3. **Dakal TC, Solieri L, Giudici P.** 2014. Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. Int J Food Microbiol **185**:140-157.
4. **Martorell P, Stratford M, Steels H, Fernandez-Espinar MT, Querol A.** 2007. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. Int J Food Microbiol **114**:234-242.
5. **Fleet G.** 1992. Spoilage yeasts. Crit Rev Biotechnol **12**:1-44.
6. **Hohmann S, Krantz M, Nordlander B.** 2007. Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol* **428**:29-45.
7. **van Zyl PJ, Kilian SG, Prior BA.** 1990. The role of an active-transport mechanism in glycerol accumulation during osmoregulation by *Zygosaccharomyces rouxii*. Appl Microbiol Biotechnol **34**:231-235.
8. **van Zyl PJ, Prior BA, Kilian SG.** 1991. Regulation of glycerol metabolism in *Zygosaccharomyces rouxii* in response to osmotic stress. Appl Microbiol Biot **36**:369-374.
9. **Wysocki R, Chery CC, Wawrzycka D, Van Hulle M, Cornelis R, Thevelein JM, Tamas MJ.** 2001. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol **40**:1391-1401.
10. **Fu D, Libson A, Miercke LJ, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J, Stroud RM.** 2000. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. Science **290**:481-486.
11. **Luyten K, Albertyn J, Skibbe WF, Prior BA, Ramos J, Thevelein JM, Hohmann S.** 1995. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. EMBO J **14**:1360-1371.

12. **Nozawa A, Takano J, Kobayashi M, von Wiren N, Fujiwara T.** 2006. Roles of *BOR1*, *DUR3*, and *FPS1* in boron transport and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett **262**:216-222.
13. **Ahmadpour D, Geijer C, Tamas MJ, Lindkvist-Petersson K, Hohmann S.** 2014. Yeast reveals unexpected roles and regulatory features of aquaporins and aquaglyceroporins. BBA **1840**:1482-1491.
14. **Tang XM, Kayingo G, Prior BA.** 2005. Functional analysis of the *Zygosaccharomyces rouxii* Fps1p homologue. Yeast **22**:571-581.
15. **Ferreira C, van Voorst F, Martins A, Neves L, Oliveira R, Kielland-Brandt MC, Lucas C, Brandt A.** 2005. A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell **16**:2068-2076.
16. **Kayingo G, Martins A, Andrie R, Neves L, Lucas C, Wong B.** 2009. A permease encoded by *STL1* is required for active glycerol uptake by *Candida albicans*. Microbiol **155**:1547-1557.
17. **Duskova M, Ferriera C, Lucas C, Sychrova H.** 2015. Two glycerol uptake systems contribute to the high osmotolerance of *Zygosaccharomyces rouxii*. Mol Microbiol **97**:541-559.
18. **Yang F, Hanna MA, Sun R.** 2012. Value-added uses for crude glycerol-a byproduct of biodiesel production. Biotechnol Biofuels **5**:13.
19. **Nielsen J, Jewett MC.** 2008. Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res **8**:122-131.
20. **Borodina I, Nielsen J.** 2014. Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. Biotechnol J **9**:609-620.
21. **Saha BC, Racine FM.** 2011. Biotechnological production of mannitol and its applications. Appl Microbiol Biotechnol **89**:879-891.
22. **Chujo M, Yoshida S, Ota A, Murata K, Kawai S.** 2015. Acquisition of the ability to assimilate mannitol by *Saccharomyces cerevisiae* through dysfunction of the general corepressor Tup1-Cyc8. Appl Environ Microbiol **81**:9-16.
23. **Duskova M, Borovikova D, Herynkova P, Rapoport A, Sychrova H.** 2015. The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions. FEMS Microbiol Lett **362**:1-8.
24. **Thomas BJ, Rothstein R.** 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. Cell **56**:619-630.

25. **Guldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH.** 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**:2519-2524.
26. **Yamanishi M, Katahira S, Matsuyama T.** 2011. *TPS1* terminator increases mRNA and protein yield in a *Saccharomyces cerevisiae* expression system. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**:2234-2236.
27. **Maresova L, Sychrova H.** 2007. Applications of a microplate reader in yeast physiology research. *Biotechniques* **43**:667-672.
28. **Lages F, Lucas C.** 1995. Characterization of a glycerol/H⁺ symport in the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila*. *Yeast* **11**:111-119.
29. **Sherman DJ, Martin T, Nikolski M, Cayla C, Souciet JL, Durrens P, Consortium G.** 2009. Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acids Res* **37** D550-554.
30. **Cherry JM, Hong EL, Amundsen C, Balakrishnan R, Binkley G, Chan ET, Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Engel SR, Fisk DG, Hirschman JE, Hitz BC, Karra K, Krieger CJ, Miyasato SR, Nash RS, Park J, Skrzypek MS, Simison M, Weng S, Wong ED.** 2012. *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Res* **40**:D700-705.
31. **Benson DA, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW.** 2014. GenBank. *Nucleic Acids Res* **42**:D32-37.
32. **Inglis DO, Arnaud MB, Binkley J, Shah P, Skrzypek MS, Wymore F, Binkley G, Miyasato SR, Simison M, Sherlock G.** 2012. The *Candida* genome database incorporates multiple *Candida* species: multispecies search and analysis tools with curated gene and protein information for *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Nucleic Acids Res* **40**:D667-674.
33. **Quain DE, Boulton CA.** 1987. Growth and metabolism of mannitol by strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **133**:1675-1684.
34. **Prior C, Potier S, Souciet JL, Sychrova H.** 1996. Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na⁺/H⁺-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **387**:89-93.
35. **Banuelos MA, Sychrova H, Bleykasten-Grosshans C, Souciet JL, Potier S.** 1998. The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiol* **144** (Pt 10):2749-2758.

36. **Sutherland FCW, Lages F, Lucas C, Luyten K, Albertyn J, Hohmann S, Prior BA, Kilian SG.** 1997. Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**:7790-7795.
37. **Van Aelst L, Hohmann S, Zimmermann FK, Jans AW, Thevelein JM.** 1991. A yeast homologue of the bovine lens fibre MIP gene family complements the growth defect of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant on fermentable sugars but not its defect in glucose-induced RAS-mediated cAMP signalling. *EMBO J* **10**:2095-2104.
38. **Eberhardt I, Hohmann S.** 1995. Strategy for deletion of complete open reading frames in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **27**:306-308.
39. **Kinclova-Zimmermannova O, Zavrel M, Sychrova H.** 2005. Identification of conserved prolyl residue important for transport activity and the substrate specificity range of yeast plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporters. *J Biol Chem* **280**:30638-30647.
40. **Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP, Boles E.** 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **464**:123-128.
41. **Mortimer RK, Johnston JR.** 1986. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**:35-43.
42. **Hill JE, Myers AM, Koerner TJ, Tzagoloff A.** 1986. Yeast *Escherichia coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**:163-167.
43. **Kinclova O, Ramos J, Potier S, Sychrova H.** 2001. Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol Microbiol* **40**:656-668.
44. **Pereira I, Madeira A, Prista C, Loureiro-Dias MC, Leandro MJ.** 2014. Characterization of new polyol/H⁽⁺⁾ symporters in *Debaryomyces hansenii*. *PLoS One* **9**:e88180.
45. **Liu X, Mortensen UH, Workman M.** 2013. Expression and functional studies of genes involved in transport and metabolism of glycerol in *Pachysolen tannophilus*. *Microb Cell Fact* **12**:27.

TABLES

TABLE 1 List of strains

Strain	Description	Source
<i>S. cerevisiae</i> W303-1A	MATa <i>ura3-1 leu2-3/112 trp1-1 his3-11/15 ade2-1 can1-100 GAL SUC2 mal0</i>	(24)
<i>fps1Δ</i>	W303-1A <i>fps1Δ::LEU2</i>	(37)
<i>fps1Δ stl1Δ</i>	W303-1A <i>fps1Δ::LEU2 stl1Δ::kanMX</i>	This study
<i>fps1Δ stl1Δ::ZrSTL1</i>	W303-1A <i>fps1Δ::LEU2 stl1Δ::ZrSTL1-TPS1^T-kanMX</i>	This study
<i>fps1Δ stl1Δ::ZrSTL2</i>	W303-1A <i>fps1Δ::LEU2 stl1Δ::ZrSTL2-TPS1^T-kanMX</i>	This study
<i>fps1Δ stl1Δ::ScSTL1</i>	W303-1A <i>fps1Δ::LEU2 stl1Δ::ScSTL1-TPS1^T-kanMX</i>	This study
<i>hog1Δ stl1Δ</i>	YSH 818 <i>stl1Δ::kanMX</i>	This study
YSH 818	W303-1A <i>hog1Δ::LEU2</i>	(38)
BW31a	W303-1A <i>nha1::LEU2 ena1Δ::HIS3::ena4Δ</i>	(39)
CEN.PK-1C	MATa <i>ura3-52 his3-Δ1 leu2-3,112 trp1-289, MAL2-8c SUC2</i>	EUROSCARF, Germany
EBY VW.4000	CEN.PK2-1C <i>hxt17Δ hxt13Δ hxt15Δ hxt16Δ hxt14Δ hxt12Δ hxt9Δ hxt11Δ hxt10Δ hxt8Δ hxt514Δ hxt2Δ hxt367Δ gal2Δ stl1Δ agt1Δ ydl247wΔ yjr160cΔ</i>	(40)
BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF, Germany
S288C	wild type	(41)

TABLE 2 Plasmids used in this study

Plasmid	Description	Source
YEp352	<i>ScURA3</i> , 2 μ , Amp ^R , ori	(42)
pNHA1-985	Derived from YEp352, <i>NHA1^P-NHA1</i>	(43)
pNHA1-985GFP	<i>ScURA3 NHA1^P-NHA1-GFP</i> , 2 μ , Amp ^R , ori	(43)
pUG6	<i>loxP-TEF2^P-kanMX-TEF2^T-loxP</i> , Amp ^R , ori	(25)
<u>Constructed episomal plasmids</u>		
YEp352-ZrSTL1	Derived from pNHA1-985, <i>NHA1^P-ZrSTL1</i>	
YEp352-ZrSTL2	Derived from pNHA1-985, <i>NHA1^P-ZrSTL2</i>	
YEp352-ScSTL1	Derived from pNHA1-985, <i>NHA1^P-ScSTL1</i>	
pGRU1-ZrSTL1	Derived from pNHA1-985GFP, <i>NHA1^P-ZrSTL1-GFP</i>	
pGRU1-ZrSTL2	Derived from pNHA1-985GFP, <i>NHA1^P-ZrSTL2-GFP</i>	
pGRU1-ScSTL1	Derived from pNHA1-985GFP, <i>NHA1^P-ScSTL1-GFP</i>	
<u>Constructed integrative plasmids</u>		
YEp352-ZrSTL1-TPS1t-kanMX	Derived from YEp352-ZrSTL1, <i>NHA1^P-ZrSTL1-TPS1^T, loxP-TEF2^P-kanMX-TEF2^T-loxP</i>	
YEp352-ZrSTL2-TPS1t-kanMX	Derived from YEp352-ZrSTL2, <i>NHA1^P-ZrSTL2-TPS1^T, loxP-TEF2^P-kanMX-TEF2^T-loxP</i>	
YEp352-ScSTL1-TPS1t-kanMX	Derived from YEp352-ScSTL1, <i>NHA1^P-ScSTL1-TPS1^T, loxP-TEF2^P-kanMX-TEF2^T-loxP</i>	

^P, promoter; ^T, terminator

TABLE 3 Kinetic parameters of glycerol uptake in cells from the exponential phase of growth in YEPG.

Strain	K _m [mM]	V _{max} [μ mol.h ⁻¹ g d.w. ⁻¹]
W303 <i>fps1Δ</i> <i>stl1::ZrSTL1</i>	5.10 ± 0.20	654.9 ± 17.3
<i>stl1::ScSTL1</i>	4.03 ± 0.36	653.0 ± 34.8

TABLE 4 Comparison of published glycerol transporters

Yeast	Gene name	Protein	Size	Identity	Function	Reference
<i>S. cerevisiae</i>	SACE0D16852g	ScStl1	1710 bp	569 aa 100 %	A	(15)
<i>Z. rouxii</i>	ZYRO0E01210g	ZrStl1	1779bp	593 aa 63 %	A	(17)
<i>Z. rouxii</i>	ZYRO0E01188g	ZrStl2	1962 bp	654 aa 59 %	A	(17)
<i>C. albicans</i>	CAALBQ5A8J5	CaStl1	1641 bp	546 aa 63 %	A	(16)
<i>C. albicans</i>	CAALBorf.7093	CaStl2	1659 bp	485 aa 38 %	C	(16)
<i>D. hansenii</i>	DEHA2E01386	DhStl1	1650 bp	549 aa 62 %	B	(44)
<i>P. tannophilus</i>	PATAJQ481633	PtStl1	1728 bp	575 aa 35 %	C	(45)
<i>P. tannophilus</i>	PATAJQ481634	PtStl2	1905 bp	634 aa 30 %	C	(45)

Identities are relative to *S. cerevisiae* ScStl1p. Function (FCN): A – confirmed glycerol transporter by expression and kinetic parameters; B – presumed glycerol transporter, not fully confirmed; C – not known.

TABLE S1 Primers used in this study (5' - 3')

Name	Sequence
<u>Gene deletion</u>	
<i>ScSTL1</i> -kanMX-F	aattatttgtatacgtgttctagcatacaagtagaataaataaaaaatagaaaaatagaacatagaaagt ttagaccTTCGTACGCTGCAGGTCGAC
<i>ScSTL1</i> -kanMX-R	gcggcaaggaacaaatataaaccccgcaaaatgctttcttaagtaaattacaaaatagattgtgagtt gtgtgtgaaGCATAGGCCACTAGTGGATCTG
<u>Gene replacement</u>	
<i>ScSTL1</i> prom-	caagtagaataaataaaaaatagaaaaatagaacatagaaagtttagaccATGAAGGATT
<i>ScSTL1</i> kanMX-F	TAAAATTATCGAATTTCAAAGGCAAATTTATAAGC
<i>ScSTL1</i> prom-	caagtagaataaataaaaaatagaaaaatagaacatagaaagtttagaccATGGGTAAAA
<i>ZrSTL1</i> kanMX-F	GAACACAAGGTTTCATGGACTATGTATTCAGC
<i>ScSTL1</i> prom-	caagtagaataaataaaaaatagaaaaatagaacatagaaagtttagaccATGGCTGCAA
<i>ZrSTL2</i> kanMX-F	GTAGTGTGAGTGAAAAGGATATACCTCCAGATAACCG
kanMX- <i>ScSTL1</i> term-R	gctttcttaagtaaattacaaaatagattgtgagttgtgtgtgaaGCATAGGCCACTAGT GGATCTG
<u>Diagnostic primers</u>	
<i>ScSTL1</i> -362upF	cctcgccaggtgcagctattgcgc

<i>ScSTL1</i> -242inR	gcgccctgcactacagttgcg
<i>ScSTL1</i> -283in-F	ccgccggaagaagtttgagg
<i>ScSTL1</i> -383down-R	gaacatccatggcggcaccctgc
<i>ZrSTL1</i> -290in2-F	catggatggttgctcatcg
<i>ZrSTL1</i> -227in1-R	acactagcataacgatcattatcac
<i>ZrSTL2</i> -211in2-F	ttggagagttgccgccaagt
<i>ZrSTL2</i> -365in1-R	acagcagtagccgaacaaagaac
kanMX-R1	ctctggcgcatcgggc
kanMX-F1	catttgatgctcgatga
PNHA1-1	caactctgtgatatagc
RGFP-1	ctgggtatctagcaaac
M13-univF	gtaaaacgacggccagt
<i>TPS1</i> term-130in-R	ggagaggacgtgtggcg
<i>TPS1</i> term-63in-F	ccgtataggccctcttttctc
YEp352-6to <i>URA3</i> -R	gtattataagtaaagcatg
<u>Plasmid construction</u>	
YEpN- <i>ZrSTL1</i> -F	gtacattataaaaaaaaaatcctgaacttagctagatattatggGTAAAAGAACACAAGG
YEpN- <i>ZrSTL1</i> -R	cacgacgttgtaaacgacggccagtccaagcttgcattgtaagGATCGTTATGATGT AC
pGRU1N- <i>ZrSTL1</i> -R	taaagctccggagcttgcattgcctgcaggtcgactctAGGATCGTTATGATGTAC
YEpN- <i>ZrSTL2</i> -R	cacgacgttgtaaacgacggccagtccaagcttgcattgtaagCGTGAGGAGCCCCG TC
YEpN- <i>ZrSTL2</i> -F	gtacattataaaaaaaaaatcctgaacttagctagatattatggCTGCAAGTAGTGTGAG
pGRU1N- <i>ZrSTL2</i> -R	taaagctccggagcttgcattgcctgcaggtcgactctAGCGTGAGGAGCCCCGCTC
YEpN- <i>ScSTL1</i> -F	gtacattataaaaaaaaaatcctgaacttagctagatattATGAAGGATTTAAAATTAT CG
YEpN- <i>ScSTL1</i> -R	cacgacgttgtaaacgacggccagtccaagcttgcattgTCAACCCTCAAATTTG CTTTATCG
pGRU1N- <i>ScSTL1</i> -R	taaagctccggagcttgcattgcctgcaggtcgactctACCCTCAAATTTGCTTTAT CGTTCACTGTATCTTC
<i>ScSTL1</i> - <i>TPS1</i> term-F	TGAAGATACAGTGAACGATAAAGCAAATTTTGAGGGTTGAtga accgatgcaaatgagacgatcgtctattcctgtccgg
<i>ZrSTL1</i> - <i>TPS1</i> term-F	GCTCTAATGTGGAAGCACCAATTCCAGTACATCATAACGATC

<i>ZrSTL2-TPS1</i> term-F	CTTAAtgaacccgatgcaaatgagacgatcgtctattcctggtccgg CGGCTCTTCTTCGTCGCGTGAATCTGAGCGGGCTCCTCACGCT TAAAtgaacccgatgcaaatgagacgatcgtctattcctggtccgg
<i>TPS1</i> term-kanMX-R	CGAAGTTATATTAAGGGTTGTCGACCTGCAGCGTACGAAtgttc gaagaagagatcagcgcgggagagaaagaaagag
<i>TPS1</i> term-kanMX-F	ctctttctttctctcccgcgctgatctcttcttcgaaacaTTCGTACGCTGCAGGTCGAC gcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcGCATAGGCCA CTAGTGGATCTG
kanMX-Yep352-R	

DNA sequences complementary to the sequences of *kanMX*, *ScSTL1*, *ZrSTL1* and *ZrSTL2* are shown in capital letters.

FIGURE LEGENDS

FIG 1 Growth of routinely used laboratory *S. cerevisiae* strains on YNB-D and YNB-M media. Cells were incubated at 30 °C for 3 days.

FIG 2 Growth phenotype and accumulation of ^{14}C -glycerol in *S. cerevisiae* *hog1Δ stl1Δ* transformed with empty vector YEp352, YEp352-*ScSTL1* and YEp352-*ZrSTL1*. For growth assays, cells were grown on solid media supplemented with KCl, NaCl and 10 mM glycerol as indicated. Plates were incubated at 30 °C for 5 days.

(A) Growth on YNB-M media (BSM w/o uracil).

(B) Growth on YNB-L media (BSM w/o uracil).

(C) Growth on YEPG media.

(D) Accumulation of ^{14}C -glycerol in *S. cerevisiae* *hog1Δ stl1Δ* [YEp352] (●), [YEp352-*ScSTL1*] (■) and [YEp352-*ZrSTL1*] (▲) in YEPG medium.

FIG 3 Subcellular localisation of *ScStl1*-GFP, *ZrStl1*-GFP and *ScNha1*-GFP in *S. cerevisiae* *hog1Δ stl1Δ* exponentially growing in liquid YNB-D or in YPEG media.

FIG 4 Growth phenotype of *S. cerevisiae* BY4741 and W303 *fps1Δ* transformed with empty vector YEp352, YEp352-*ScSTL1* and YEp352-*ZrSTL1*.

(A) Growth on solid YNB-M media (BSM w/o uracil) without or supplemented with 10 mM glycerol.

(B) Growth curves of *S. cerevisiae* BY4741 [YEp352] (●), [YEp352-*ScSTL1*] (■) and [YEp352-*ZrSTL1*] (▲) in liquid YNB-M media (BSM w/o uracil) without or supplemented with 10 mM glycerol.

FIG 5 Growth of *S. cerevisiae* *fps1Δ*, *fps1Δ stl1Δ*, *fps1Δ stl1::ScSTL1* and *fps1Δstl1::ZrSTL1* on YPM or YPL. Cells were incubated for 5 days at 30 °C.

FIG 6 Growth phenotype and accumulation of ^{14}C -glycerol in *S. cerevisiae* *fps1Δ*, *fps1Δ stl1Δ*, *fps1Δstl1::ScSTL1* and *fps1Δstl1::ZrSTL1*.

(A) Accumulation of ^{14}C -glycerol by *S. cerevisiae* *fps1Δ* (▼), *fps1Δ stl1Δ* (●), *fps1Δ stl1::ScSTL1* (■) and *fps1Δ stl1::ZrSTL1* (▲) exponentially growing in YEPG medium.

(B) Growth of *S. cerevisiae* *fps1Δ*, *fps1Δ stl1Δ*, *fps1Δ stl1::ScSTL1* and *fps1Δ stl1::ZrSTL1* on YEPG supplemented with 0.3 M NaCl and 0.4 M KCl. Cells were incubated at 30 °C for 5 days.

FIG 7 Eadie-Hofstee plots of initial uptake rates of ^{14}C -glycerol in exponentially growing *S. cerevisiae* in YEPG.

(A) *fps1Δ stl1::ScSTL1*

(B) *fps1Δ stl1::ZrSTL1*

FIG S1 (A) Accumulation ratio of ^{14}C -glycerol in *S. cerevisiae* *fps1Δ stl1Δ*, *fps1Δ stl1::ZrSTL2* (open bars) and in *S. cerevisiae* *hog1Δ stl1Δ* transformed with empty vector YEp352 and with YEp352-*ZrSTL2* (black bars) grown in YEPG media. The plot shows the accumulation ratio after 45 min and the bars represent the mean \pm standard deviation of three biological replicates.

(B) Localisation of ZrStl2-GFP in *S. cerevisiae* *hog1Δ stl1Δ* exponentially growing in YEPG.

FIG S2 The accumulation of ^{14}C -glycerol by *S. cerevisiae* grown in YEPG (closed symbols). Efflux of radiolabelled glycerol after the addition of the ionophore CCCP to a final concentration 50 μM is represents by open symbols, the addition is marked by red line (35 minutes after the start of reaction). Semi-opened symbols represents the accumulation with 50 μM CCCP from the beginning of reaction.

(A) *hog1Δ stl1Δ* [*ZrSTL1*-YEp352] (\blacktriangle)

(B) *hog1Δ stl1Δ* [*ScSTL1*-YEp352] (\blacksquare)

(C) *fps1Δ stl1::ZrSTL1* (\blacktriangle)

(D) *fps1Δ stl1::ScSTL1* (\blacksquare)

FIGURES

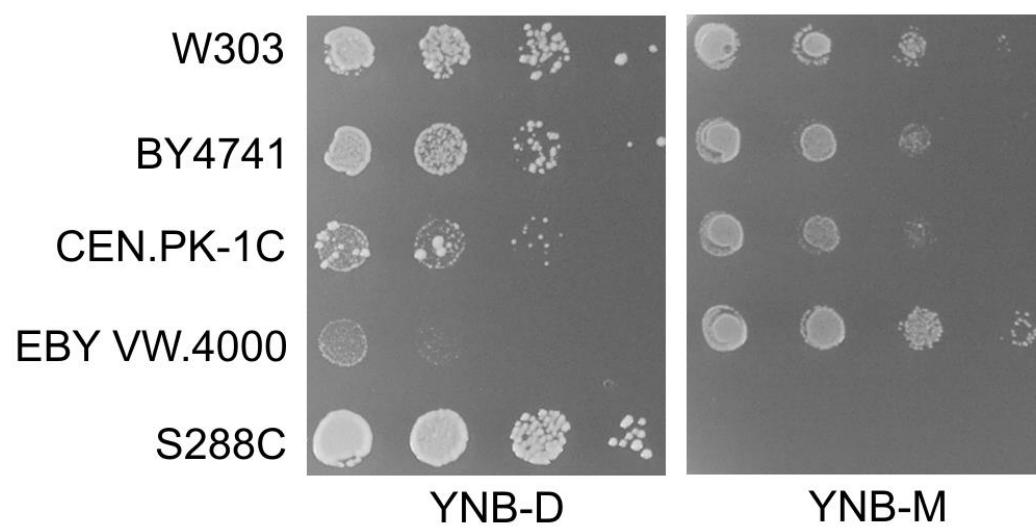


FIG 1

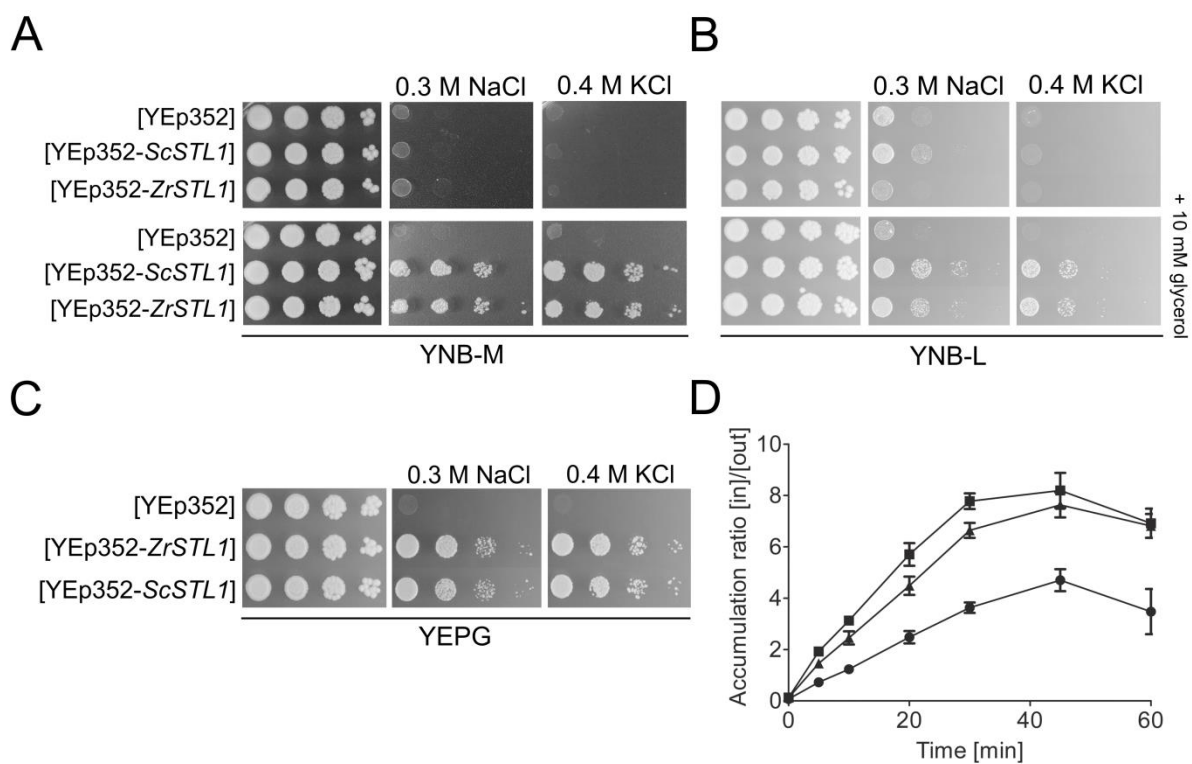


FIG 2

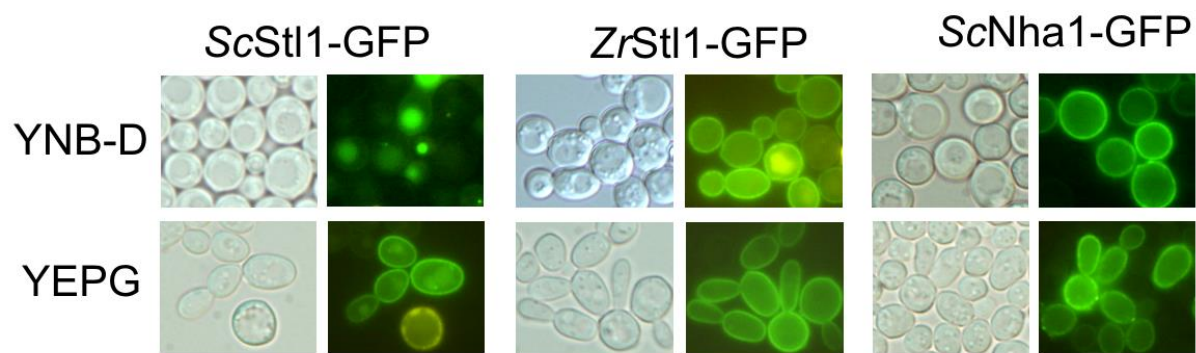
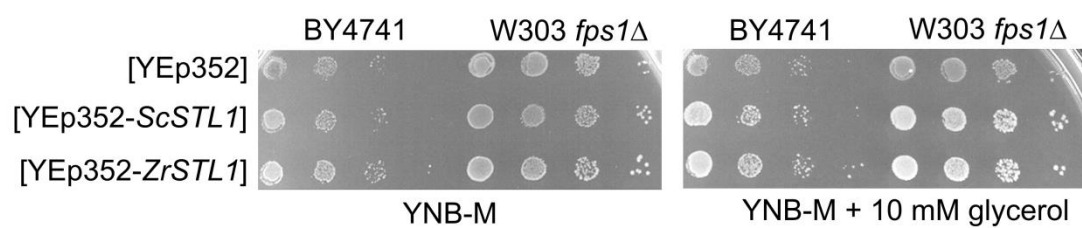


FIG 3

A



B

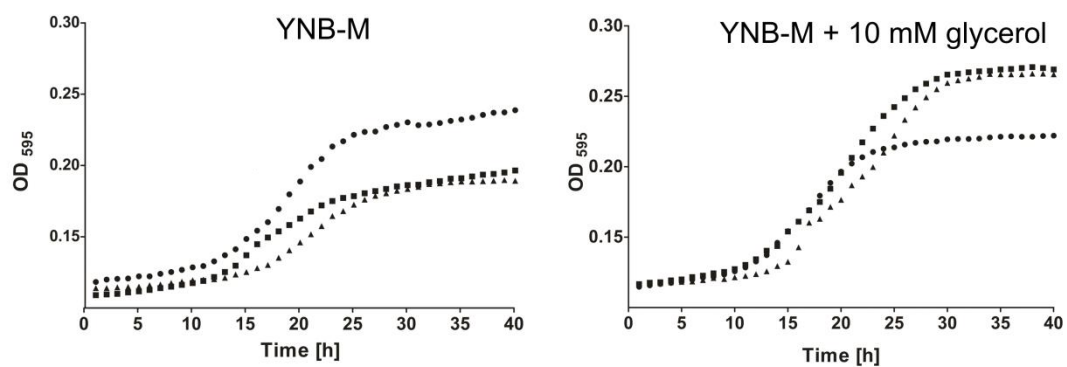


FIG 4

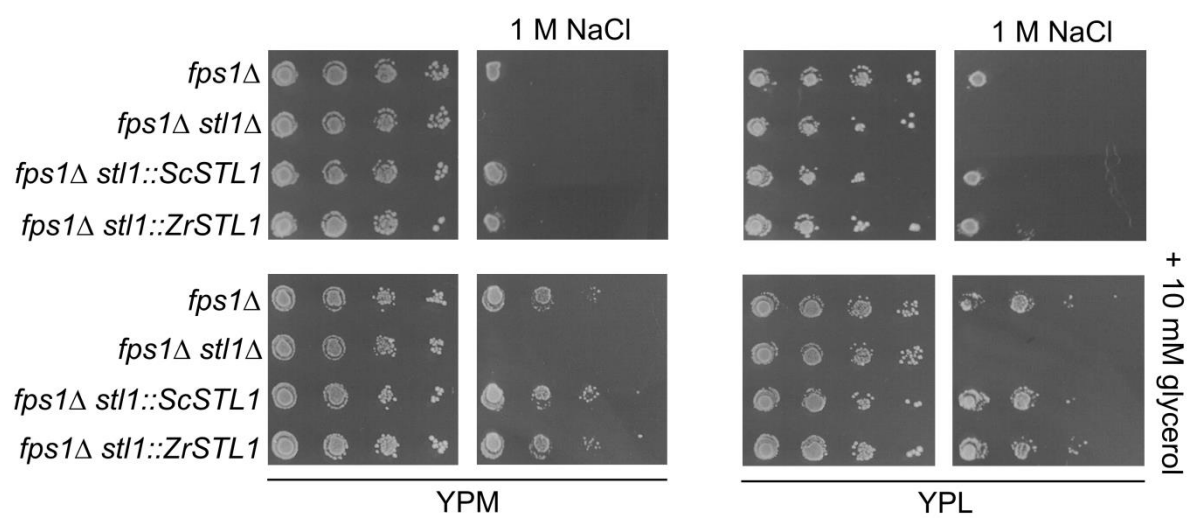


FIG 5

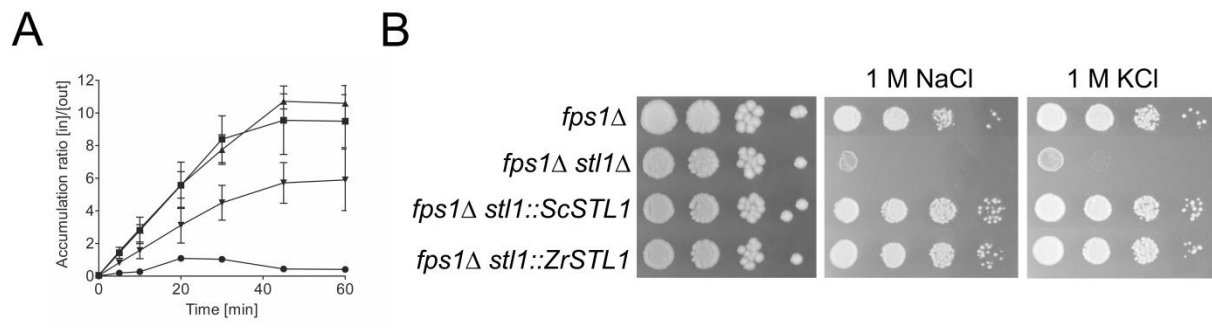


FIG 6

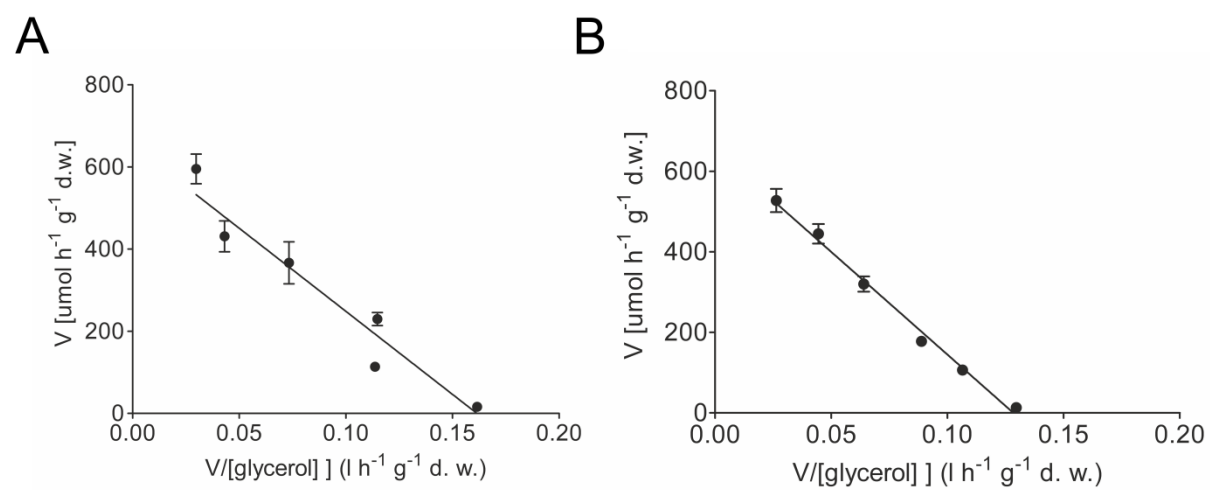
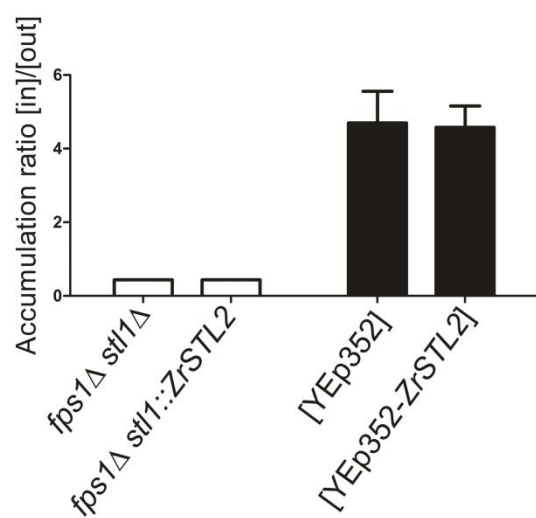


FIG 7

A



B

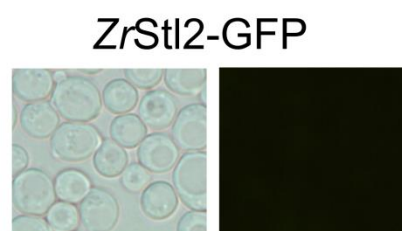


FIG S1

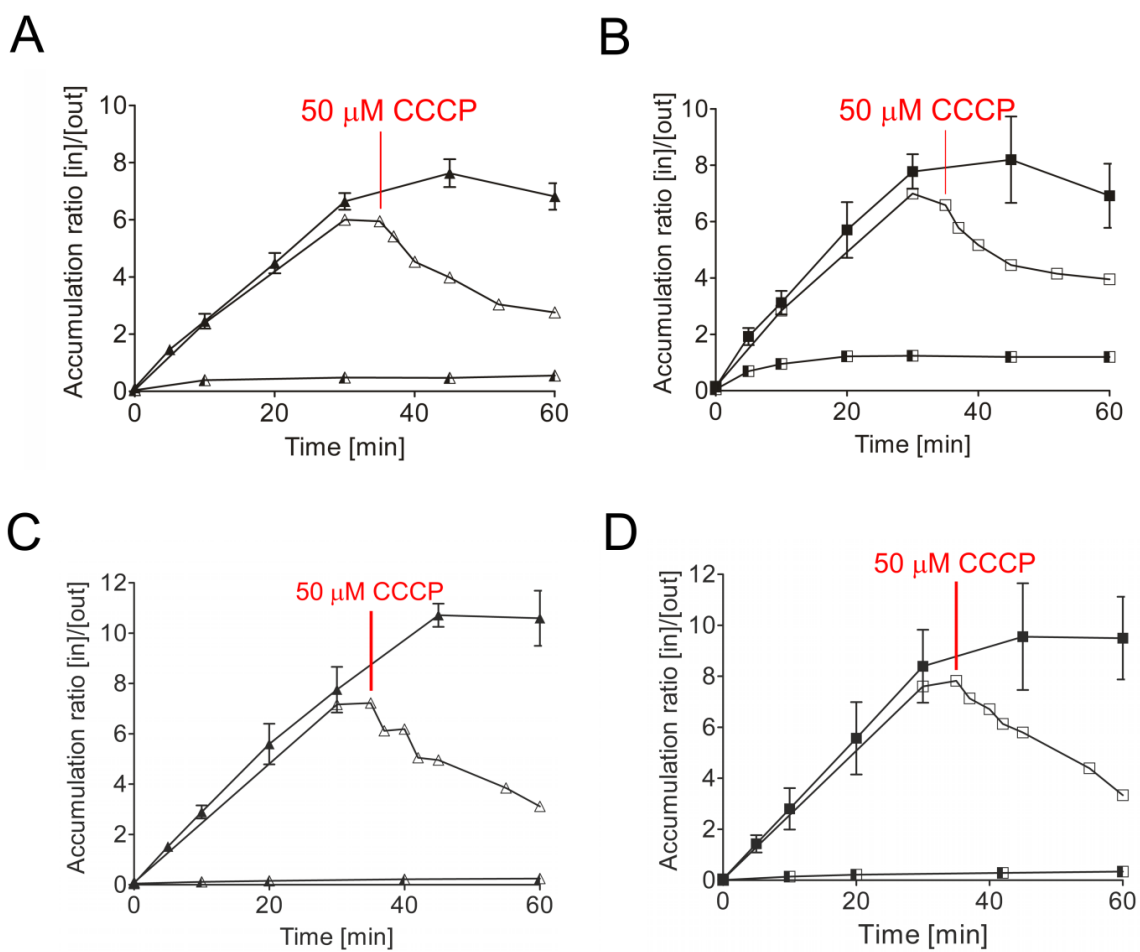


FIG S2

4.5 Nepublikované výsledky – Aktivní přenašeče glycerolu v *Debaryomyces hansenii*

Jak je již zmíněno v úvodu, kvasinka *D. hansenii* patří mezi velice odolné druhy, které jsou schopné nejen čelit vysokým koncentracím solí, ale jejichž růst je navíc přítomností menšího množství solí urychlován (Thome-Ortiz *et al.*, 1998, Prista *et al.*, 1997). Tato výjimečná vlastnost je spojována s odlišnou vnitrobuněčnou úlohou Na^+ a K^+ iontů, s vyšším počtem osmo-senzorů, transportérů, ale také s odlišným metabolismem vnitřních osmolytů, v porovnání s *S. cerevisiae* (Breuer & Harms, 2006). Hlavním osmolytem je podobně jako v případě ostatních diskutovaných kvasinkových druhů glycerol, jehož funkce je však ve stacionárních buňkách *D. hansenii* nahrazena arabitolem (Larsson & Gustafsson, 1987). Podle nedávné studie a výsledků získaných v rámci této dizertační práce by mohl být glycerol do buněk *D. hansenii* přenášen osmi přenašeči (Palma *et al.*, 2007), přičemž v případě ani jednoho z nich nebylo potvrzeno, že se jedná o transportér glycerolu či čehokoliv jiného. V minulosti se objevily celkem dvě práce snažící se o charakterizaci některých z těchto údajných přenašečů, ale výsledky ani jedné z nich nepřinášejí přesvědčivé potvrzení, že se skutečně jedná o transportéry glycerolu v *D. hansenii* (Pereira *et al.*, 2014, González-Hernández, 2010). Tato kapitola nepublikovaných výsledků se také zabývá charakterizací jednoho z osmi možných glycerolových přenašečů v *D. hansenii*. Vzhledem k absenci nástrojů genového inženýrství se však podobně jako v případě výše zmíněných publikací omezuje pouze na heterologní expresi jednoho z nalezených genů *DhSTL* v *S. cerevisiae*. Heterologní exprese byla provedena dvěma způsoby. V prvním případě byl gen umístěn do mnohokopiového plasmidu za slabý konstitutivní promotor. Druhým z použitých přístupů byla integrace genu do genomu kvasinky *S. cerevisiae* do lokusu *ScSTL1*. Charakterizace je obohacena o detailní bioinformatickou analýzu všech osmi potencionálních přenašečů a to především na úrovni proteinů.

4.5.1 Bioinformatická analýza genů kódujících možné kandidáty na glycerolové přenašeče v *D. hansenii*

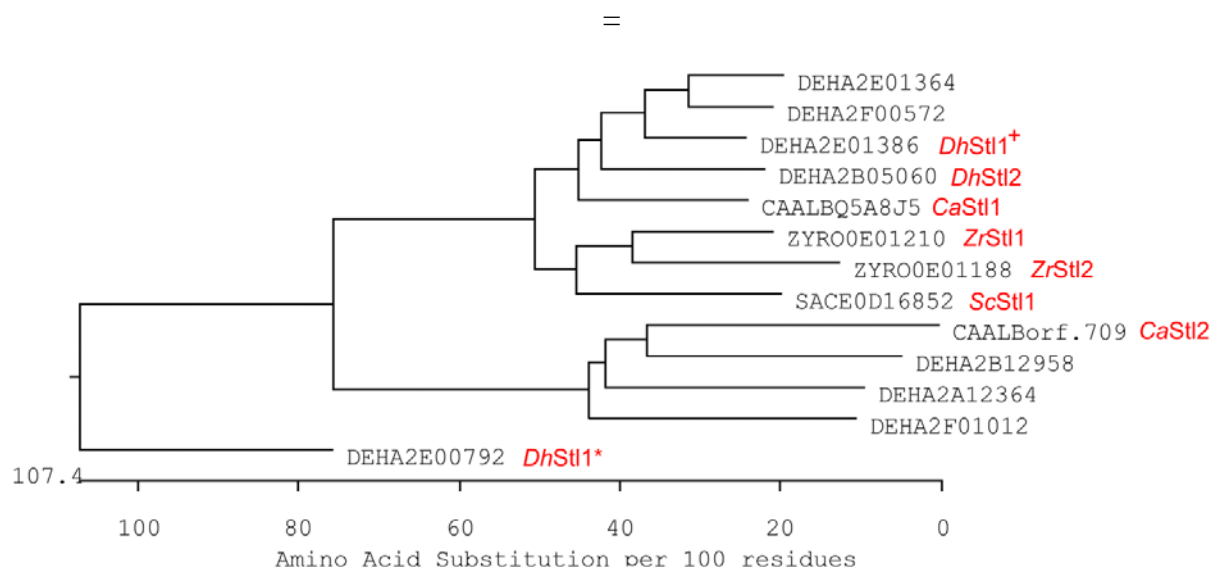
Genom kvasinky *D. hansenii* CBS 767 obsahuje celkem osm otevřených čtecích rámců, které jsou na základě své podobnosti s *ScSTL1* (SACE0D16852g, YDR536W) považovány za pravděpodobné přenašeče glycerolu (Génolevures; Sherman *et al.*, 2009). Tabulka 2 obsahuje informace o úrovni identity mezi glycerolovým přenašečem *ScStl1* a všemi údajnými přenašeči z *D. hansenii*. Informace o charakterizovaných transportérech z kvasinek *Z. rouxii* a *C. albicans* jsou v tabulce zmíněny z důvodu větší ilustrativnosti.

Z tabulky je patrné, že oba přenašeče z kvasinky *Z. rouxii*, *CaStl1* z *C. albicans* a podobně také čtyři z osmi proteinů nalezených v *D. hansenii* dosahují úrovně identity s *ScStl1* okolo 60 %. Je tedy velice pravděpodobné, že tyto čtyři zástupci budou přenášet glycerol přes plasmatickou membránu *D. hansenii*. Zbylé čtyři proteiny vykazují podobnou úroveň jako *CaStl2*, v jehož případě není přesná funkce zatím známa. Získané informace jsou také znázorněny fylogenetickým stromem na Obrázku 8, kde je patrné, že všechny čtyři proteiny *DhStl* s vysokým stupněm identity klastrují s *ScStl1*, *ZrStl1*, *ZrStl2* a *CaStl1*. Naopak ty přenašeče, které se výrazněji odlišují od *ScStl1*, se shlukují ve stejné skupině jako *CaStl2*. *DhStl1** kódovaný genem DEHA2E00792g a dříve studovaný (González-Hernández, 2010) stojí mimo obě dvě skupiny porovnávaných proteinů.

Tabulka 2: Porovnání genů pro charakterizované glycerolové přenašeče s geny pro údajné přenašeče kvasinky *D. hansenii*.

Kvas. druh	gen	protein	gen (pb)	protein (aa)	identita s <i>ScStl1</i>
<i>S. cerevisiae</i>	SACE0D16852g	<i>ScStl1</i>	1710	570	100 %
<i>Z. rouxii</i>	ZYRO0E01210g	<i>ZrStl1</i>	1779	593	63 %
	ZYRO0E01188g	<i>ZrStl2</i>	1962	654	59 %
<i>C. albicans</i>	CAALBQ5A8J5	<i>CaStl1</i>	1641	547	63 %
	CAALBOrf19.7093	<i>CaStl2</i>	1659	553	38 %
<i>D. hansenii</i>	DEHA2A12364g		1659	553	39 %
	DEHA2B05060g	<i>DhStl2</i>	1650	550	59 %
	DEHA2B12958g		1686	562	37 %
	DEHA2E00792g	<i>DhStl1</i> *	1533	511	38 %
	DEHA2E01364g		1689	563	56 %
	DEHA2E01386g	<i>DhStl1</i> ⁺	1650	550	62 %
	DEHA2F00572g		1635	545	57 %
	DEHA2F01012g		1485	495	36 %

* González-Hernández (2010), ⁺ Pereira *et al.* (2014)



Obrázek 8: Fylogenetický strom. Délka větví je úměrná počtu substitucí na 100 aminokyselinových zbytků.

Na základě detailní bioinformatické analýzy byl v rámci předkládané dizertační práce studován gen nesoucí označení DEHA2B05060g, který má vysoký stupeň identity svého translačního produktu s již charakterizovaným přenašečem *ScStt1*. Pro účely této práce nese název *DhSTL2*.

4.5.2 Heterologní exprese genu *DhSTL2* v kvasince *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ stt1Δ* pomocí mnohokopiových plasmidů

Gen DEHA2B05060g, neboli *DhSTL2*, byl pomocí homologní rekombinace vložen do dvou mnohokopiových plasmidů. První z nich nese název pNHA1-985 (Kinclova *et al.*, 2001) a je odvozen od YEpl352 (Hill *et al.*, 1986). Druhým plasmidem je pNHA1-985GFP (Kinclova *et al.*, 2001), který navíc obsahuje gen pro zelený fluorescenční protein GFP a je odvozen od vektoru pGRU1 (Daignan-Fornier B., NCBI). Gen byl do vektorů vložen homologní rekombinací, vždy za *ScNHA1* promotor výměnou za gen *ScNHA1*. Amplifikace fragmentu obsahujícího gen *DhSTL2* jakožto i homologních částí z vektorů pNHA1-985 a pNHA1-985GFP byla provedena PCR, za pomoci oligonukleotidů uvedených v Tabulce 3. Genomová DNA z kvasinky *D. hansenii* CBS 767 sloužila jako templát pro PCR a byla izolována podle standardizovaného protokolu (Hoffman & Winston, 1987). Správnost konstruovaných plasmidů byla ověřena restriční analýzou, diagnostickou PCR za použití oligonukleotidů uvedených v Tabulce 3 a následně také sekvenováním. Prázdný vektor

YEp352 a dále pak plasmid YEp352-ScSTL1 byly použity jako kontroly. Konstrukce plasmidu YEp352-ScSTL1 je blíže popsána v Rukopise č. 1.

Tabulka 3: Sekvence oligonukleotidů použitých pro konstrukci plasmidů obsahujících gen *DhSTL2*.

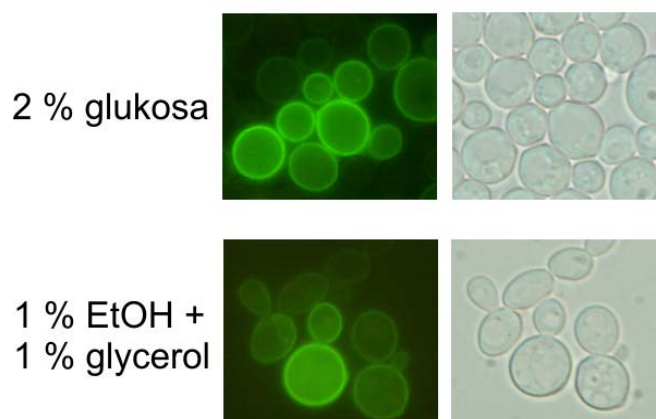
Oligonukleotid	sekvence 5'-3'
YEpN-DhSTL2-F	gtacattataaaaaaaaaatcctgaacttagctagatattATGTATAAAAATATGGTCAA AAACTAACACTATGGG
YEpN-DhSTL2-R	cacgacgttgtaaacgacggccagtgccaagcttgcagTTAAACTTCCGCAGGC TTAACTGAAGCGGC
DhSTL2-pGRU1N-R	taaagctccggagcttgcagtcgactctAACTTCCGCAGGCTTAACT GAAGCGGCTTCATTTGAGCC
<u>Diagnostické oligonukleotidy</u>	
DhSTL2-287in-R	GGCCTTCTACCATACTTATCACC
DhSTL2-257in-F	CCGAGACTGCTGGTCGTGAGTTGG
PNHA1-1	caactctgtgtgatatagc
RGFP-1	ctgggtatctagcaaac
M13-univF	gtaaaacgacggccagt

Sekvence odpovídající genu *DhSTL2* jsou znázorněny velkými písmeny.

4.5.2.1 Lokalizace *DhStl2* v buňkách *S. cerevisiae*

K určení lokalizace proteinu *DhStl2* exprimovaného v buňkách *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ stl1Δ* bylo využito jeho C-koncové označení pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP). Toho bylo docíleno v plasmidu pGRU1-DhSTL2, kde byl gen *DhSTL2* pod kontrolou slabého konstitutivního promotoru *ScNHA1* a k jeho 3'konci byla připojena před kodon STOP sekvence *GFP*. Lokalizace *DhStl1*-GFP v buňkách *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ stl1Δ* byla pozorovatelná fluorescenční mikroskopií.

Obrázek 9 ukazuje, že protein *DhStl2* je lokalizován na buněčné periférii, tedy v plasmatické membráně buněk *S. cerevisiae* a to bez ohledu na použitý zdroj uhlíku. Znamená to tedy, že *DhStl2* je schopen dosáhnout plasmatické membrány a není inaktivován a degradován glukosou, jak je tomu v případě *ScStl1* (Rukopis č. 1; Ferreira *et al.*, 2005).

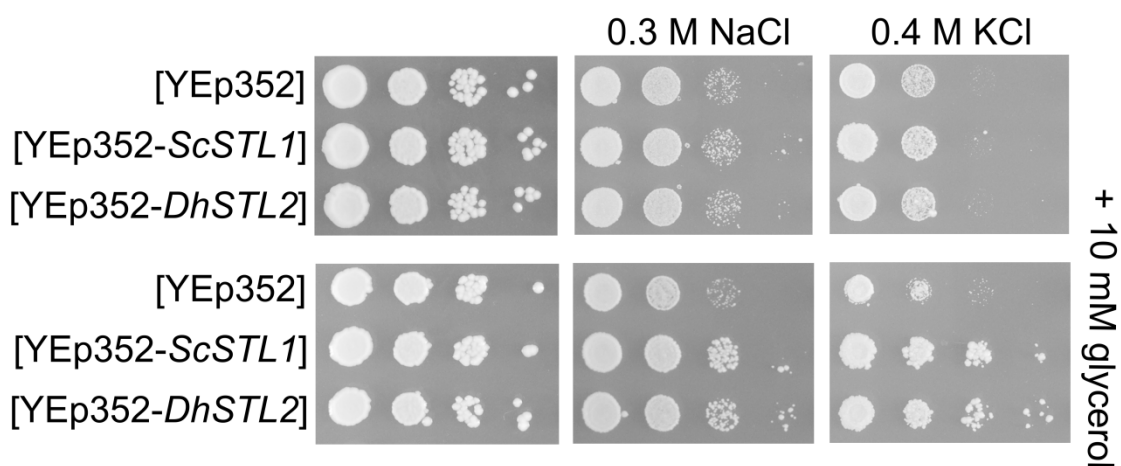


Obrázek 9: Lokalizace proteinu *DhStl2* v buňkách *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ stl1Δ* rostoucích v minimálním médiu s 2% glukosou jako zdrojem uhlíku (horní panel) nebo v médiu YEPG, kde byl jako zdroj uhlíku použit 1% etanol a 1% glycerol (dolní panel).

4.5.2.2 Fenotypová charakterizace buněk *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ stl1Δ* s plasmidem YEp352-DhSTL2

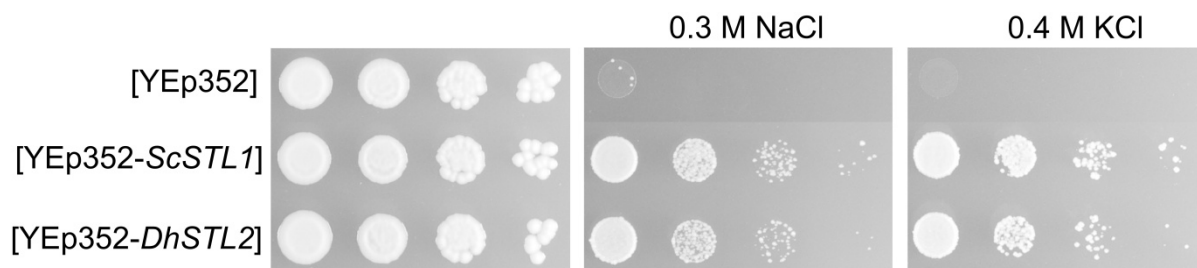
K odhalení vlivu genu *DhSTL2* na růst buněk *S. cerevisiae* a jejich schopnost aktivně akumulovat glycerol byl použit stejný kmen jako v případě určování lokalizace produktu tohoto genu, tedy *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ stl1Δ*. Jedná se o osmosenzitivní kmen, který není schopen v důsledku delece genu *ScHOG1* účinně reagovat na změny osmotického tlaku a současně postrádá systém pro aktivní transport glycerolu do buněk. Citlivost těchto buněk je patrná již z Obrázku 10 (horní panel), kde buňky s prázdným vektorem vykazují zhoršený růst na médiu se solemi. Tento růstový deficit je vyrovnán v případě, že buňky exprimují geny *ScSTL1* nebo *DhSTL2* a jsou-li současně pěstovány na médiu, kam je přidáno malé množství glycerolu (dolní panel). Je tedy patrné, že *DhStl2* je za těchto podmínek schopen zastoupit funkci *ScStl1* a napomoci buňkám vyrovnat se tak se stresovými podmínkami.

ScSTL1/ScStl1 je znám díky své represi/inaktivaci glukosou. V našem případě byla potencionální represe překonána použitím konstitutivního promotoru *ScNHA1*. Inaktivací již syntetizovaného proteinu *ScStl1* bylo zamezeno přidavkem solí do růstového média, tedy zvýšením osmotického tlaku.



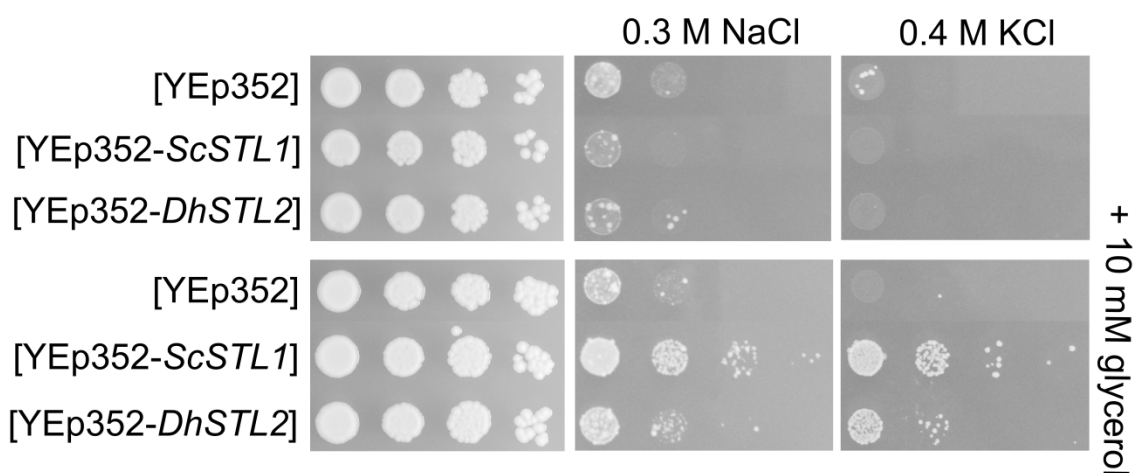
Obrázek 10: Růst buněk *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ stl1Δ* transformovaných plasmidy YEp352 (negativní kontrola), YEp352-ScSTL1 (pozitivní kontrola) a YEp352-DhSTL2. Buňky byly testovány na pevném YNB-médiu s 2% glukosou jako zdrojem uhlíku, BSM bez uracilu, přidavkem solí a 10 mM glycerolu. Růst buněk byl zachycen 3. den po inokulaci.

Takřka totožné chování buněk jako na médiu s glukosou bylo zaznamenáno i na médiu, kde byly použity glycerol a etanol jako zdroje uhlíku (Obrázek 11). *DhStl2* je i zde schopen účinně komplementovat fenotyp delece genu *ScSTL1*.

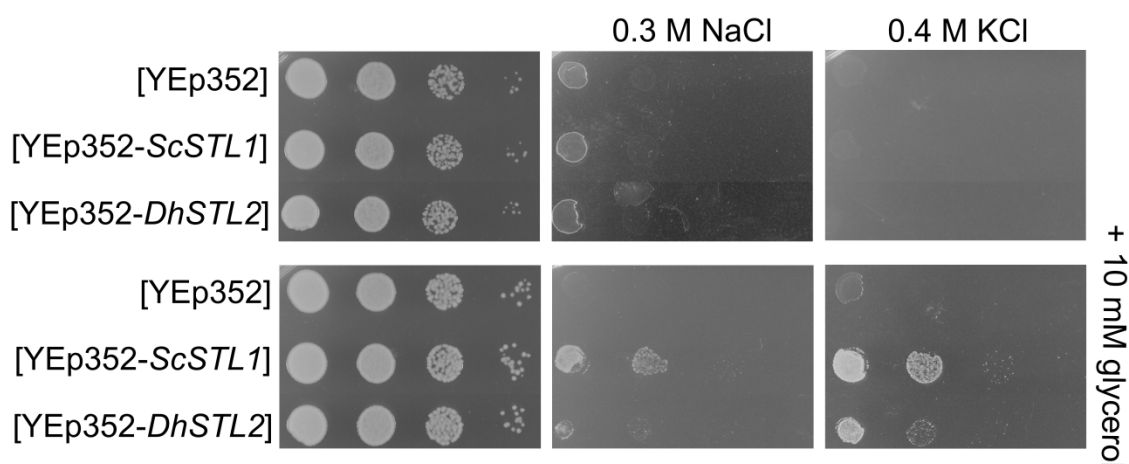


Obrázek 11: Růst buněk *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ stl1Δ* transformovaných plasmidy YEp352 (negativní kontrola), YEp352-ScSTL1 (pozitivní kontrola) a YEp352-DhSTL2. Buňky byly testovány na pevném YEPG-médiu s 1% etanolem a 1% glycerolem jako zdroji uhlíku. Růst buněk byl zachycen 5. den po inokulaci.

Další z testovaných podmínek, bylo minimální médium s 2% manitolem nebo 0,1% lysinem (lysin byl použit jako zdroj uhlíku). Důvodem využití těchto alternativních zdrojů uhlíku bylo především zamezení jakékoliv inaktivace proteinu *ScStl1*. Z Obrázků 12 a 13 je patrné, že buňky produkující sobě vlastní *ScStl1* mnohem snáze čelí osmotickému stresu v případě, že mají v médiu malé množství glycerolu, které mohou transportovat do buněk. V případě buněk nesoucích plasmid YEp352-DhSTL2 již není zlepšení růstu tak výrazné, v porovnání s YEp352-ScSTL1 je spíše zanedbatelné.



Obrázek 12: Růst buněk *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ stl1Δ* transformovaných plasmidy YEp352 (negativní kontrola), YEp352-ScSTL1 (pozitivní kontrola) a YEp352-DhSTL2. Buňky byly testovány na pevném YNB médiu s 0,1% lysinem jako zdrojem uhlíku, BSM bez uracilu, přidavkem solí a 10 mM glycerolu. Růst buněk byl zachycen 7. den po inokulaci.



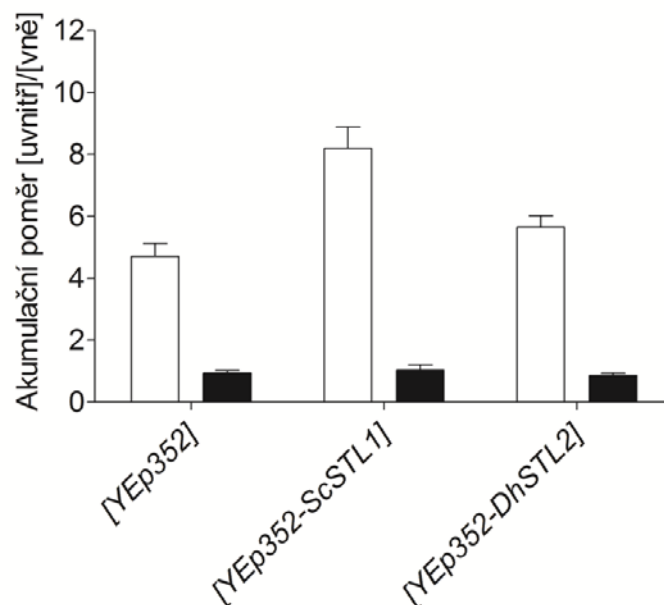
Obrázek 13: Růst buněk *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ stl1Δ* transformovaných plasmidy YEp352 (negativní kontrola), YEp352-ScSTL1 (pozitivní kontrola) a YEp352-DhSTL2. Buňky byly testovány na pevném YNB médiu s 2% manitolem jako zdrojem uhlíku, BSM bez uracilu, přidavkem solí a 10 mM glycerolu. Růst buněk byl zachycen 5. den po inokulaci.

4.5.2.3 Akumulace radioaktivně značeného glycerolu buňkami *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ stl1Δ* nesoucími plasmid YEp352-DhSTL2

Pro ověření zda gen *DhSTL2* kóduje přenašeč glycerolu, který může být snadno exprimován v buňkách *S. cerevisiae* byla měřena akumulace radioaktivně značeného glycerolu v buňkách. Metodika práce je blíže popsána v Publikaci č. 3 a Rukopise č. 1.

Buňky *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ stl1Δ* nesoucí plasmidy YEp352 (negativní kontrola), YEp352-ScSTL1 (pozitivní kontrola) a YEp352-DhSTL2 byly pěstovány ve dvou druzích médií, minimální YNB médium s glukosou a bohaté médium s kombinací etanolu a glycerolu jako zdrojů uhlíku (YEPG). Z Obrázku 14 je patrné, že v případě, kdy byly buňky pěstovány v médiu s glukosou (černé sloupečky), nedocházelo k akumulaci glycerolu. 45 minut po přidání ^{14}C -glycerolu byla jeho koncentrace uvnitř a vně buněk takřka totožná, bez ohledu na přítomnost prázdného vektoru či plasmidu s geny *STL*. Tyto výsledky naznačují, že i přes konstitutivní expresi a jeho zjevnou lokalizaci v membráně buněk *S. cerevisiae* (Obrázek 9) jsou produkty obou genů inaktivovány glukosou. K této inaktivaci zřejmě nedochází v případě, kdy jsou buňky pěstovány v přítomnosti solí (Obrázek 10).

V případě použití glycerolu a etanolu jako zdroje uhlíku je situace poněkud odlišná (Obrázek 14, prázdné sloupečky). Buňky nesoucí gen *ScSTL1* dosahují přibližně 8x vyšší koncentrace ^{14}C -glycerolu uvnitř, v porovnání s okolním prostředím. U negativní kontroly (buňky s plasmidem YEp352) je obsah glycerolu uvnitř buněk po 45 minutách akumulace přibližně 5x vyšší. Gen *DhSTL2* způsobí pouze nepatrné, statisticky nevýznamné, zvýšení akumulačního poměru, v porovnání s buňkami s prázdným vektorem, a to na hodnotu akumulačního poměru cca 6. Na základě takto malého rozdílu, nelze jednoznačně říci, že jsou tyto buňky schopny aktivně akumulovat glycerol proti směru koncentračního gradientu.

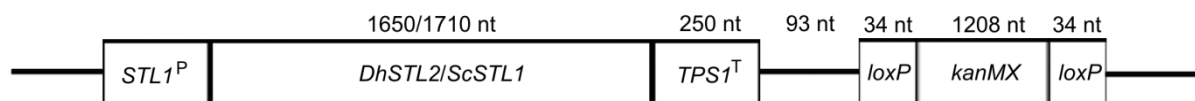


Obrázek 14: Akumulační poměry ^{14}C -glycerol v buňkách *S. cerevisiae* W303 *hog1Δ stl1Δ* transformovaných plasmidy YEp352 (negativní kontrola), YEp352-ScSTL1 (pozitivní kontrola) a YEp352-DhSTL2. Buňky byly pěstovány v YNB médiu s 2% glukosou (černé sloupce) nebo YEPG médiu s 1% etanolem a 1% glycerolem (prázdné sloupce). Graf zobrazuje akumulaci 45 minut po přidání radioaktivně značeného glycerolu. Každý sloupec představuje průměr \pm standardní chybu tří nezávislých experimentů.

4.5.3 Heterologní exprese genu *DhSTL2* integrovaného v genomu buněk *S. cerevisiae* W303 *fps1Δ*

Gen *DhSTL2* byl pomocí integrativních plasmidů vložen do genomu kvasinky *S. cerevisiae* W303 *fps1Δ* do lokusu *ScSTL1* za promotor *ScSTL1* (chromosom IV), za vzniku W303 *fps1Δ stl1::DhSTL2*. Vkládaný gen byl opatřen terminátorem *TPS1*, zvyšujícím množství výsledného proteinu (Yamanishi *et al.*, 2011). Selekční markerový gen *kanMX* zajišťující odolnost buněk k antibiotiku geneticinu byl nutnou součástí integrativního plasmidu (Obrázek 15). Pro kontrolu byl vytvořen totožný kmen, kde byl stejným způsobem vložen do genomu gen *ScSTL1*. Konstrukce integrativních plasmidů, včetně následné inkorporace fragmentů do genomu *S. cerevisiae* byla provedena homologní rekombinací. Integrativní plasmidy byly vytvořeny vložením fragmentů obsahujících *TPS1*^T a markerový gen *kanMX* do YEp352-DhSTL1 a YEp352-ScSTL1 za oba zmíněné geny. Pro syntézu fragmentů byla využita PCR a jako templát pro amplifikaci terminátoru posloužila genomová DNA izolovaná dle standardizovaného protokolu z kvasinky *S. cerevisiae* W303-1A (Hoffman & Winston, 1987). Úsek obsahující gen *kanMX* byl amplifikován za použití plasmidu pUG6 (Guldener *et al.*, 1996). Oligonukleotidy použité pro konstrukci

integrativních plasmidů a následného kmene *S. cerevisiae* s genem *DhSTL2* jsou uvedeny v Tabulce 4. Oligonukleotidy využívané pro konstrukci kontrolního kmene s genem *ScSTL1* jsou uvedeny v Rukopise č. 1. Správnost konstruovaných kmenů byla ověřena pomocí diagnostické PCR, v případě konstruovaných integrativních plasmidů navíc ještě restikční analýzou (použité diagnostické oligonukleotidy jsou uvedeny v Tabulce 4).



Obrázek 15: Oblast chromosomu IV kvasinky *S. cerevisiae* W303 *fps1Δ* po integraci fragmentu obsahujícího geny *DhSTL2* nebo *ScSTL1* za promotor *ScSTL1*. ^P – promotor; ^T – terminátor

Tabulka 4: Sekvence oligonukleotidů použitých pro konstrukci integrativních plasmidů obsahujících gen *DhSTL2*.

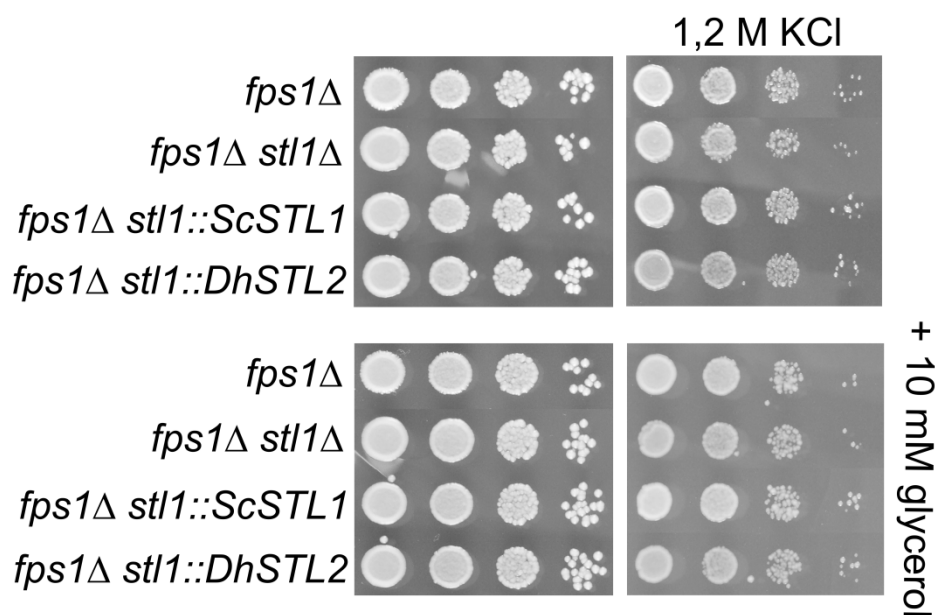
Oligonukleotid	sekvence 5'-3'
DhSTL2-TPS1term-F	GGCTCAAATGAAGCCGCTTCAGTTAAGCCTGCGGAAGTTTA Atgaaccgatgcaaatgagacgatcgtctattctggtccgg
TPS1term-kanMX-R	CGAAGTTATATTAAGGGTTGTCGACCTGCAGCGTACGAAgtttc gaagaagagatcagcgcgaggagagaaagaaagag
TPS1term-kanMX-F	ctctttcttctctcccgcgctgatctcttcttcgaaacaTTCGTACGCTGCAGGTCGAC gcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcacaggcGCATAGGCCA
kanMX-Yep352-R	CTAGTGGATCTG
ScSTL1prom- DhSTL2kanMX-F	caagtagaataaataaaaaatagaaaaatagaaacatagaaagtttagaccATGTATAAAA TATGGTCAAAAACATACTATGGGACTCAGAGG
kanMX-ScSTL1term-R	gctttcttaagtaaattacaaaatagattgtgagttgtgtgtgaaGCATAGGCCACTAGT GGATCTG
<u>Diagnostické oligonukleotidy</u>	
DhSTL2-287in-R	GGCCTTCTACCATACTTATCACC
DhSTL2-257in-F	CCGAGACTGCTGGTCGTGAGTTGG
kanMX-R1	CTCTGGCGCATCGGGC
kanMX-F1	CATTTGATGCTCGATGA
PNHA1-1	caactctgtgtgatatagc
M13-univF	gtaaacgacggccagt
TPS1term-130in-R	ggagaggacgtgtggcg
TPS1term-63in-F	ccgtataggccctcttttctc
YEp352-6toURA3-R	gtattataagtaaataatgcatg

Sekvence odpovídající genům *DhSTL2* a *kanMX* jsou znázorněny velkými písmeny.

4.5.3.1 Fenotypová charakterizace buněk *S. cerevisiae* W303 *fps1Δ* s integrací genu *DhSTL2*

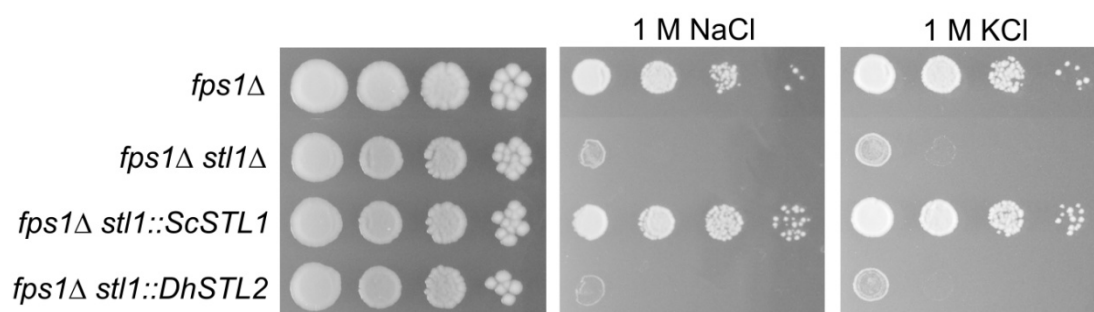
Nově konstruované kmeny *S. cerevisiae* s chromosomální integrací genu *DhSTL2* byly podrobně fenotypově charakterizovány, především testováním jejich růstu za různých stresových i nestresových podmínek. U všech experimentů byly použity tři kontrolní kmeny. První, *S. cerevisiae* W303 *fps1Δ* je nositelem nezměněné verze genu *ScSTL1*, druhým kontrolním kmenem byl W303 *fps1Δ stl1Δ*, tedy kmen postrádající jak kanál Fps1, tak i aktivní glycerolový přenašeč Stl1. Posledním kmenem byl W303 *fps1Δ stl1::ScSTL1*. Ten sloužil pro potvrzení správného integrování genu *DhSTL2/ScSTL1* do genomu kvasinky *S. cerevisiae* W303 *fps1Δ*.

Růst kmenů byl testován za obdobných podmínek jako v případě autonomních plasmidů (kapitola 4.5.2.2.), pouze s tím rozdílem, že pro kmeny s integrací bylo použito bohaté médium. První z testovaných podmínek bylo bohaté YPD-médium s přídavkem 1,2 M KCl (Obrázek 16). Z obrázku je patrné, že kmeny produkující funkční přenašeč glycerolu *ScStl1* (W303 *fps1Δ*, W303 *fps1Δ stl1::ScSTL1*) rostou na médiu s vyšším osmotickým tlakem o něco lépe, než buňky W303 *fps1Δ stl1Δ* a současně také W303 *fps1Δ stl1::DhSTL2*. Toto pozorování potvrzuje, že represivní účinek glukosy na gen *ScSTL1* je překonán se zvyšujícím se osmotickým tlakem a současně také, že přítomnost genu *DhSTL2* není schopna zlepšit růst buněk.



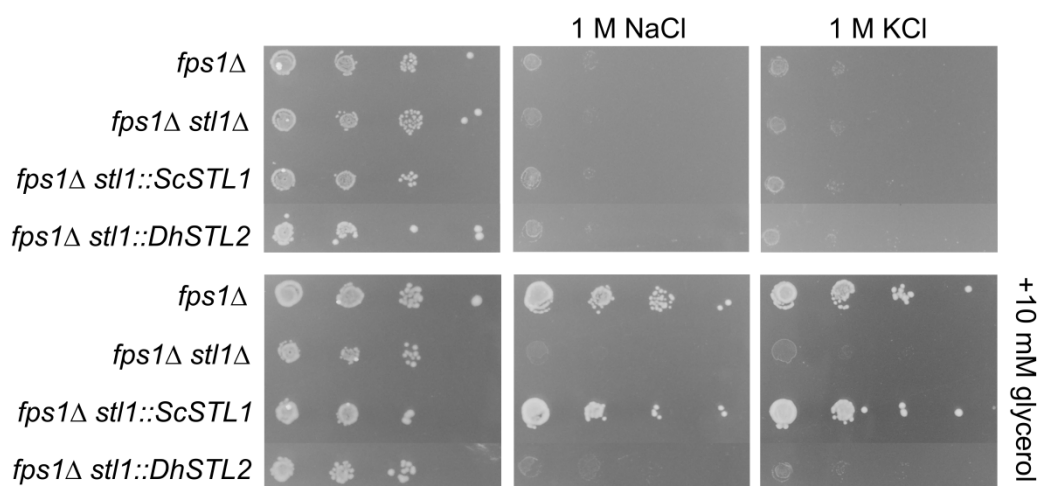
Obrázek 16: Růst buněk *S. cerevisiae* W303 *fps1Δ*, *fps1Δ stl1Δ*, *fps1Δ stl1::ScSTL1* a *fps1Δ stl1::DhSTL2* na YPD-médiu s přídavkem 1,2 M KCl a 10 mM glycerolu. Růst buněk byl zachycen 3. den po inokulaci.

Výrazné zlepšení růstu buněk produkujících přenašeč *ScStl1* na YEPG-médiu je patrné z Obrázku 17. Přídavek 1 M KCl nebo NaCl způsobil takřka zastavení růstu dvojitého mutantního kmene (*fps1Δ stl1Δ*) a současně také kmene s integrací genu *DhSTL2*. Vysvětlením takto významného rozdílu v růstu (vzhledem ke kontrolním kmenům *fps1Δ stl1::ScSTL1* a *fps1Δ*) může být buď nedostatečná exprese genu *DhSTL2*, popřípadě nefunkčnost produktu tohoto genu v buňkách *S. cerevisiae* (za předpokladu, že je exprimován) nebo neschopnost *DhStl2* přenášet glycerol do buněk. Zhoršení růstu všech kmenů oproti YPD-médiu s přídavkem 1,2 M NaCl (Obrázek 16) zle přisuzovat použitému zdroji uhlíku. Buňky rostlé na bohatém zdroji uhlíku se snáz vyrovnávají se stresovými podmínkami a mohou tak vykazovat výrazně lepší růstové vlastnosti.

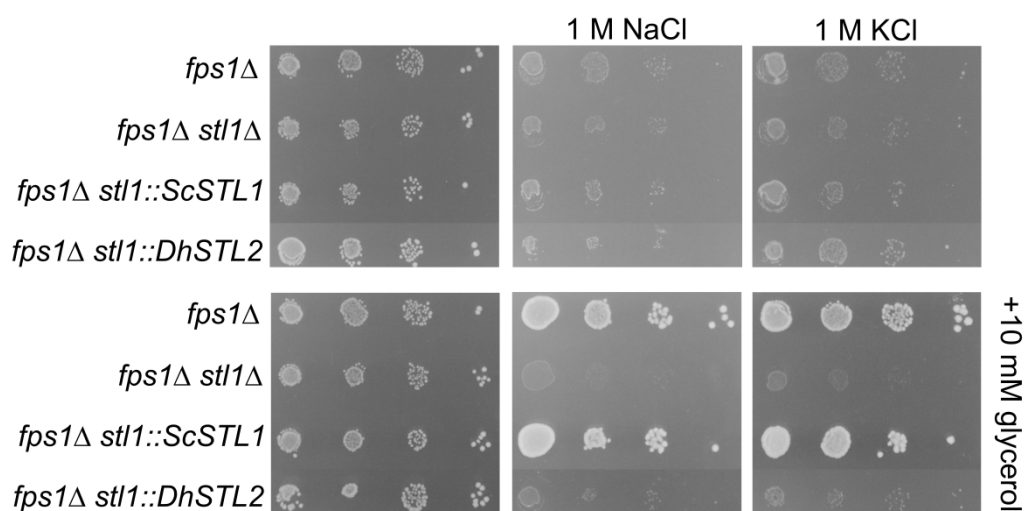


Obrázek 17: Růst buněk *S. cerevisiae* W303 *fps1Δ*, *fps1Δ stl1Δ*, *fps1Δ stl1::ScSTL1* a *fps1Δ stl1::DhSTL2* na YEPG-médiu s přídavkem 1 M KCl a NaCl. Růst buněk byl zachycen 5. den po inokulaci.

Podobný fenotyp jako v případě buněk pěstovaných na YEPG-médiu byl pozorován i za použití YPL (0,1 % lysin jako zdroj uhlíku; Obrázek 18) a YPM (2% manitol jako zdroj uhlíku; Obrázek 19). V obou zmíněných případech došlo k významnému zlepšení růstu buněk exprimujících gen *ScSTL1* na médiích a obsahem solí a současně 10 mM glycerolu, v porovnání s médiem bez přídavku glycerolu. Dvojitý mutantní kmen a ani *fps1Δ stl1::DhSTL2* nevykazovali zlepšení v růstu za těchto podmínek.



Obrázek 18: Růst buněk *S. cerevisiae* W303 *fps1Δ*, *fps1Δ stl1Δ*, *fps1Δ stl1::ScSTL1* a *fps1Δ stl1::DhSTL2* na YPL-médiu (YP + 0.1% lysin) s přidavkem 1 M NaCl, 1 M KCl a 10 mM glycerolu. Růst buněk byl zachycen 5. den po inokulaci.

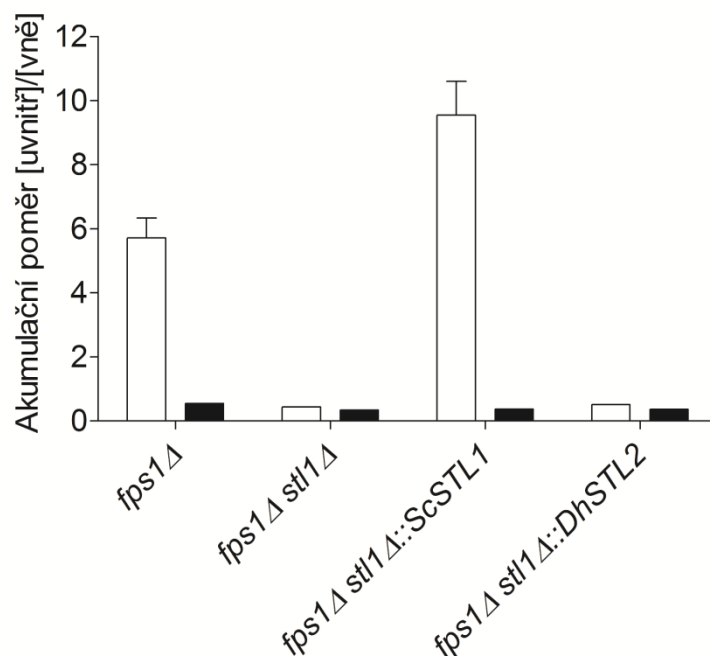


Obrázek 19: Růst buněk *S. cerevisiae* W303 *fps1Δ*, *fps1Δ stl1Δ*, *fps1Δ stl1::ScSTL1* a *fps1Δ stl1::DhSTL2* na YPM-médiu (YP + 2% manitol) s přidavkem 1 M NaCl, 1 M KCl a 10 mM glycerolu. Růst buněk byl zachycen 5. den po inokulaci.

4.5.3.2 Akumulace radioaktivně značeného glycerolu buňkami *S. cerevisiae* W303 *fps1Δ* s integrací genu *DhSTL2*

Stanovení akumulace radioaktivně značeného glycerolu buňkami *S. cerevisiae* s integrovanými geny bylo taktéž použito k ověření funkce *DhStl2* v *S. cerevisiae*. Nejprve byla měřena akumulace v buňkách rostlých v YPD-médiu, tedy v prostředí, kde je promotor *ScSTL1* přirozeně negativně ovlivňován glukosou. Černé sloupečky v Obrázku 20,

znázorňující akumulací poměr po 45 minutách naznačují, že ani jeden z testovaných kmenů nebyl schopen akumulovat glycerol proti směru koncentračního gradientu. V případě použití YEPG-média, kdy promotor *ScSTL1* není reprimován glukosou je patrné, že buňky W303 *fps1Δ*, tedy kmen s nezměněnou formou genu *ScSTL1* dosáhl přibližně 6x vyšší vnitrobuněčné koncentrace v porovnání s venkovním prostředím. V případě buněk W303 *fps1Δ stl1::ScSTL1* je akumulací poměr více než 10. Rozdíl mezi kmenem s přirozenou formou genu *ScSTL1* a nově integrovanou, je s nejvyšší pravděpodobností zapříčiněn přítomností *TPS1* terminátoru, který má za úkol zvyšovat množství translačního produktu, v tomto případě *ScStl1*. Z obrázku je také patrné, že dvojitý mutant a stejně tak kmen s integrací genu *DhSTL2* není schopen akumulovat glycerol proti koncentračnímu gradientu.



Obrázek 20: Akumulační poměry ^{14}C -glycerolu v buňkách *S. cerevisiae* W303 *fps1Δ*, *fps1Δ stl1Δ*, *fps1Δ stl1::ScSTL1* a *fps1Δ stl1::DhSTL2*. Buňky byly pěstovány v YPD-médiu s 2% glukosou (černé sloupečky) nebo YEPG-médiu s 1% etanolem a 1% glycerolem (prázdné sloupečky). Graf zobrazuje akumulací poměr 45 minut po přidání radioaktivně značeného glycerolu. Každý sloupec představuje průměr \pm standardní chybu tří nezávislých experimentů.

4.5.4 Závěr

V této kapitole dizertační práce bylo zjištěno, že genom kvasinkového kmene *D. hansenii* CBS 767 kóduje celkem 8 možných glycerolových přenašečů. Detailní bioinformatická analýza ukázala, že pouze čtyři z těchto genů jsou blízce příbuzné s již charakterizovanými geny z kvasinek *S. cerevisiae*, *Z. rouxii* a *C. albicans*. Míra identity jejich produktů s ScStl1 se pohybuje kolem 60 %. Nejvíce podobný kandidát kódovaný genem DEHA2E01386g byl již částečně charakterizován, taktéž heterologní expresí v *S. cerevisiae* (Pereira *et al.*, 2014). Protože tato studie nepodala přesvědčivé výsledky o úspěšné heterologní expresi a potvrzení, že se skutečně jedná o přenašeč glycerolu, autorka předkládané práce se pokusila o charakterizaci druhého nejvíce identického proteinu kódovaného genem DEHA2B05060g (*DhSTL2*). Jedná se o 1650 nukleotidů dlouhý gen kódující 550 aminokyselin dlouhý protein. Vzhledem k absenci nástrojů genového inženýrství a velice omezené možnosti deletovat daný gen přímo v genomu kvasinky *D. hansenii*, jedinou možností charakterizace jak genu, tak následně i jeho produktu byla heterologní exprese v *S. cerevisiae* postrádající vlastní přenašeč ScStl1. V předkládané dizertační práci byly zvoleny dva odlišné přístupy heterologní exprese.

V prvním případě byl gen DEHA2B05060g umístěn do dvou mnohokopiových plasmidů a jeho exprese byla řízena slabým konstitutivním promotorem *ScNHA1*. Spojení s genem pro zelený fluorescenční protein prokázalo, že *DhStl2* je v buňkách *S. cerevisiae* úspěšně syntetizován a současně je také lokalizován v plasmatické membráně, bez ohledu na použitý zdroj uhlíku (Obrázek 9). Jeho lokalizace v membráně byla potvrzena i v případě, kdy hlavním zdrojem energie pro buňky byla glukosa, tedy podmínky za kterých se ScStl1 vyskytuje ve vakuolách (Rukopis č. 1). Dalším z kroků, který byl použit pro ověření funkce *DhStl2* jako glycerolového přenašeče, bylo testování růstu osmosenzitivních buněk *S. cerevisiae* (*hog1Δ stl1Δ*) exprimujících gen *DhSTL2*, za osmotického stresu. Kapkové testy z Obrázků 10, 11, 12 a 13 dokládají, že buňky, které nejsou schopny samy o sobě akumulovat glycerol, výrazně zlepši svůj růst v případě, kdy jsou nositeli plasmidu obsahujícího geny *ScSTL1* nebo *DhSTL2* a současně jsou pěstovány na médiu s přidavkem glycerolu. Pouze v případě manitolu nedosáhly buňky exprimující gen *DhSTL2* stejné úrovně růstu jako v případě kontrolních buněk s *ScSTL1*. Dalším krokem, majícím za úkol potvrdit či vyvrátit zda *DhSTL2* skutečně kóduje přenašeč glycerolu, bylo měření akumulace radioaktivně značeného glycerolu (Obrázek 14). Ani jedny z testovaných buněk pěstovaných v YNB-médiu nevykazovaly schopnost aktivního transportu glycerolu (akumulační poměr byl totožný

s buňkami s prázdným vektorem). Znamená to tedy, že i přestože je *DhStl2* za těchto podmínek lokalizován v plasmatické membráně, s největší pravděpodobností zde není plně funkční. Pouze mírné, statisticky nevýznamné, zvýšení akumulace oproti buňkám s prázdným vektorem bylo patrné v případě, kdy byly buňky s YEp352-DhSTL2 pěstovány v YEPG médiu. Ale ani zde nedosáhla akumulace stejného poměru jako v případě buněk produkujících přenašeč ScStl1.

Na základě získaných dat nelze jednoznačně říci, zda gen *DhSTL2* kóduje glycerolový přenašeč. Získané výsledky však nasvědčují skutečnosti, že *DhStl2*, produkováný v *S. cerevisiae*, má s největší pravděpodobností nízkou afinitu ke glycerolu. Tím můžeme vysvětlit skutečnost, že buňky vystavené dlouhodobému stresu na médiích s vyšším obsahem solí vykazují zlepšení růstu exprimují-li gen *DhSTL2* z plasmidu. I přes nižší afinitu, protein *DhStl2* přenáší určité množství glycerolu, které má blahodárný vliv na buňky vystavené dlouhodobému stresu. Přenášené množství však není možné zaznamenat v krátkodobých experimentech jako je například stanovení akumulace radioaktivně značeného glycerolu.

Druhým přístupem, který byl využit především z důvodu potvrzení či vyvrácení úlohy *DhStl2* byla konstrukce kmenů *S. cerevisiae fps1Δ* nesoucích gen *DhSTL2* integrovaný za *ScSTL1* promotorem. Obrázky 16, 17, 18 a 19 jednoznačně potvrzují, že integrace genu *DhSTL2* do lokusu *ScSTL1* nemá žádný vliv na růst buněk, na rozdíl od *ScSTL1* exprimovaného za stejných podmínek. Stanovení akumulace ¹⁴C-glycerolu potvrdilo, že *ScSTL1* promotor je ovlivňován glukosou a současně také, že konstruovaný kmen není schopen produkovat funkční *DhStl2*, transportující glycerol do buněk. *S. cerevisiae fps1Δ stl1::DhSTL2* vykazují takřka nulovou akumulaci glycerolu jak v případě růstu na YPD, tak pokud byly pěstovány za nerepresivních podmínek s ethanolem a glycerolem (Obrázek 20).

I přes komplexnost použitého přístupu, nejsme schopni na základě výsledků této kapitoly s určitostí říci, zda gen DEHA2B05060g z kvasinky *D. hansenii* skutečně kóduje přenašeč glycerolu. S určitostí však můžeme konstatovat, že jeho heterologní exprese v *S. cerevisiae* v případě integrace genu do genomu nevedla k fenotypovému projevu odpovídajícímu přítomnosti aktivního transportéru glycerolu. Zapojení plasmidů odhalilo, že i přestože je *DhStl2* lokalizován v plasmatické membráně, není schopen přenášet glycerol do buněk proti směru koncentračního gradientu, jsou-li buňky pěstovány v přítomnosti glukosy. Testování růstu buněk však ukázalo, že v případě dlouhodobého stresu způsobeného zvýšenou koncentrací NaCl nebo KCl (Obrázky 10 – 13) mají buňky exprimující gen *DhSTL2* z mnohokopiového plasmidu jistou růstovou výhodu. Pokud by tedy gen *DhSTL2* skutečně

kódoval transportér glycerolu, tak má tento přenašeč velmi nízkou afinitu ke glycerolu a při měření jeho akumulace (Obrázek 14) se jeví jako neaktivní.

Možné vysvětlení nízké aktivity, které se nabízí, je příslušnost *D. hansenii* k tzv. CTG-skupině kvasinek. Tyto využívají alternativní genetický kód, kdy kodón CTG kóduje aminokyselinu serin. V organismech využívajících standardní genetický kód, kam patří i *S. cerevisiae*, odpovídá tomuto kodónu aminokyselina leucin. V sekvenci genu *DhSTL2* byly nalezeny celkem dva serinové zbytky odpovídající tomuto tripletu, přičemž jeden z nich se nachází v konzervované oblasti (a tedy i důležité pro správnou funkci) typické pro všechny členy rodiny cukerných přenašečů (Leandro *et al.*, 2009). Právě záměna aminokyseliny serinu za leucin v důležité oblasti kvasinkou *S. cerevisiae* může být důvodem velmi nízké transportní aktivity daného přenašeče. Poněkud odlišné výsledky získané dvěma různými přístupy nás v první řadě upozorňují na skutečnost, že charakterizace jakýchkoliv genů vždy vyžaduje komplexní řešení s více rozdílnými přístupy.

5. Souhrnný závěr a diskuze

Výsledky uvedené v předkládané dizertační práci jsou publikovány celkem ve třech odborných člancích, jednom rukopise připraveném k odeslání do tisku a část výsledků je shrnuta v kapitole s nepublikovanými výsledky. Pro experimentální práci autorka připravila celkem šest mutantních kmenů *Z. rouxii*, třináct kmenů *S. cerevisiae* a konstruovala 12 plasmidů určených pro expresi v *S. cerevisiae* a 12 určených pro *Z. rouxii*. K získání výsledků bylo využito celé škály mikrobiologických, molekulárně-biologických, biochemických a současně také biofyzikálních metod. V rámci dvou střednědobých zahraničních stáží byla navázána úzká spolupráce s portugalskou skupinou (vedoucí skupiny Prof. Cândida Lucas, University of Minho, Braga) u které si autorka detailně osvojila metodiky měření vstupu radioaktivně značeného glycerolu do buněk. Autorka předkládané dizertační práce dále úspěšně zavedla metodu qRT-PCR a optimalizovala řadu metod běžně aplikovaných ve studiu *S. cerevisiae* pro *Z. rouxii* (měření vnitrobuněčného pH, monitorování transportu protonů, monitorování aktivity ATPasy Pma1, apod.). V neposlední řadě také získala řadu zkušeností týkajících se získávání a administrace vědeckých grantů, když se stala úspěšnou hlavní řešitelkou projektu vypisovaného Grantovou agenturou Univerzity Karlovy.

Výsledky získané v rámci této práce byly publikovány v renomovaných impaktovaných časopisech a prezentovány na mezinárodních konferencích. Všechny vytyčené cíle tak byly splněny v plné šíři.

V rámci této práce:

- 1) Byly podrobně charakterizovány nekonvenční kvasinkové druhy *Z. rouxii*, *D. hansenii* a *P. sorbitophila*. Bylo zjištěno, že jednotlivé kvasinky se příliš neliší co do základních fyziologických parametrů jako je velikost buněk, růstová kapacita apod. Největší rozdíly byly zaznamenány ve schopnosti přežít anhydrobiosu, přítomnost toxických iontů a vyrovnat se s nedostatkem K⁺ (viz. kapitola 4.1).
- 2) Byla provedena detailní *in silico* analýza genomů kvasinek *Z. rouxii*, *D. hansenii* a celé řady dalších druhů. V kmeni *Z. rouxii* CBS 732^T byly nalezeny dva geny homologní k *ScSTL1*, v kvasince *D. hansenii* CBS 767 pak celkem osm homologů. Bioinformatická analýza čítající více jak padesát možných přenašečů kódovaných geny *STL* v genomech takřka 20 kvasinkových druhů odhalila jejich vzájemnou

příbuznost a současně také poodkryla jejich význam pro osmotoleranci jednotlivých druhů (viz. kapitoly 4.3 a 4.5).

- 3) Byla konstruována série mutantních kmenů *S. cerevisiae* (odvozených od dvou kmenů s rozdílným genetickým pozadím, BY4741 a W303) postrádajících geny *HOG1*, *STL1* a *FPS1* v různých kombinacích. Byla provedena detailní fenotypová charakterizace vzniklých mutantních kmenů a objeveny dosud nepublikované funkce produktů těchto genů v kvasince *S. cerevisiae* (viz. kapitola 4.2).
- 4) Dva geny *STL* identifikované v kvasince *Z. rouxii* (*ZrSTL1* a *ZrSTL2*) a jeden kandidát z *D. hansenii* (*DhSTL2*) byly exprimovány v *S. cerevisiae* dvěma odlišnými přístupy, stabilní expresí integrovaných genů a současně také expresí z mnohokopiových plasmidů (viz. kapitoly 4.3, 4.4 a 4.5). Heterologní exprese plně funkčního proteinu byla úspěšná pouze v případě *ZrStl1*, který je podle získaných výsledků schopen zcela zastoupit funkci *ScStl1* (na základě kinetických parametrů, růstových schopností, apod.). Důvodem neúspěchu exprese genu *ZrSTL2* je pravděpodobně odlišná signální sekvence na N-konci výsledného proteinu. V případě *DhSTL2* je s největší pravděpodobností problém v nízké aktivitě exprimovaného proteinu v důsledku odlišného kódování aminokyseliny serinu v *D. hansenii* (CTG-skupina kvasinek).
- 5) Nad rámec vytyčených cílů bylo zjištěno, že heterologní exprese genu *ZrSTL1* může za vhodně zvolených podmínek výrazně zlepšit růstové vlastnosti kmenů *S. cerevisiae* produkujících například bioetanol z manitolu (viz. kapitola 4.4).
- 6) Byly detailně charakterizovány geny *ZrSTL1* a *ZrSTL2* v kvasince *Z. rouxii* (viz. kapitola 4.3). Byly konstruovány dvě série mutantních kmenů odvozených od dvou kmenů *Z. rouxii* s různými auxotrofními mutacemi. Na základě studia těchto kmenů bylo zjištěno, že oba geny kódují přenašeče transportující glycerol v symportu s protony podobně účinně. Dále byl prokázán jejich význam pro fyziologii *Z. rouxii* za nestresových podmínek, jejich uplatnění při udržování vnitrobuněčného pH, schopnosti přežít hypoosmotické podmínky a současně byla také odhalena odlišná úroveň jejich regulace. Dále bylo zjištěno, že fruktosa je hlavním regulátorem přenosu glycerolu v *Z. rouxii*. Delece genu *ZrSTL2* navíc odhalila přítomnost třetího, doposud neznámého přenašeče s nízkou afinitou ke glycerolu, ale vysokou kapacitou přenosu.
- 7) Nad rámec stanovených cílů bylo zjištěno, že H^+ -ATPasa *ZrPma1* je podobně jako *ScPma1* aktivována glukosou a fruktosou, na rozdíl od galaktosy, manitolu či glycerolu. Tato skutečnost byla ověřena jak měřením alkalizace buněčného cytosolu,

tak současně sledováním acidifikace média po přidání různých zdrojů uhlíku (viz. kapitola 4.3).

Výsledky získané v rámci této dizertační práce napomohly hlubšímu porozumění životní strategie nekonvenčních osmotolerantních kvasinek. Obecná charakterizace několika běžně studovaných kvasinkových kmenů (Publikace č. 1, kapitola 4.1) se stala dobrým odrazovým můstkem pro následné detailnější studium kvasinek *Z. rouxii* a *D. hansenii*. V rámci této publikace si autorka nejen osvojila velké množství nejrozličnějších metod, ale získané výsledky mají i velký význam pro vědeckou veřejnost zabývající se studiem kvasinek. Žádná z dosud zveřejněných prací se totiž nezabývala problematikou osmotolerantních kvasinek takto komplexně. Získané výsledky mimo jiné poukazují na skutečnost, že i přestože jsou všechny studované kmeny považovány za osmotolerantní, jejich skutečná tolerance k jednotlivým druhům stresu se může značně lišit.

Účinný metabolismus glycerolu je ve velké míře zodpovědný za schopnost kvasinek přežívat změny koncentrace osmoticky aktivních látek v prostředí. Před řadou let byla vyslovena hypotéza, že osmotolerance kvasinek jde ruku v ruce s metabolismem glycerolu. Nejedná se však pouze o syntézu glycerolu *de novo*, která je pro buňky značně energeticky náročná, ale především také o účinné mechanismy jeho transportu (Lages *et al.*, 1999). Tyto skutečnosti nás vedly k hledání genů, kódujících možné přenašeče pro vstup glycerolu do buněk (homologní geny k *ScSTL1* a *CaSTL1*), ve zveřejněných sekvencích genomů nejrozličnějších kvasinek. Výsledkem této detailní analýzy bylo zjištění, že druhy, které jsou obecně považovány za osmotolerantní, obsahují více genů kódujících možné přenašeče glycerolu. Na základě těchto zjištění, jsme se rozhodli pro detailní charakteristiku genů *STL* v kvasinkách *Z. rouxii* a *D. hansenii*. I přestože kmen *Z. rouxii* CBS 732^T nepatří (na základě výsledků z Publikace č. 1) k nejvíce tolerantním, velká část dizertační práce se zabývá právě charakterizací transportního systému pro glycerol v tomto kmeni (Publikace č. 3). Důvodem našeho výběru byla nejen znalost sekvence genomu a existence nástrojů genového inženýrství, a tím i snadná manipulace, ale současně také skutečnost, že v tomto kmeni byly již v minulosti charakterizovány některé jiné geny (*ZrHOG1*, *ZrFFZ1*, *ZrFFZ2*, *ZrFSY1*, *ZrFPS1*, *ZrENA1*, *ZrTRK1*, atd.). Naše rozhodnutí bylo tedy motivováno snahou o charakterizaci dalších genů a tím i hlubší porozumění životní strategie jednoho z nekonvenčních osmotolerantních kvasinkových druhů (čím více genů v daném kmeni budeme znát, tím komplexnější pohled na jeho metabolismus můžeme získat). Výjimečnost získaných výsledků spočívá především ve skutečnosti, že *Z. rouxii* je první kvasinkový druh,

u něhož došlo k charakterizaci dvou plně funkčních glycerolových přenašečů typu Stl. Oba přenašeče vykazují vysokou afinitu ke glycerolu a navíc nejsou reprimovány glukosou, jako je tomu v případě *S. cerevisiae*. Získané výsledky dále poukazují na velice komplexní řízení akumulace glycerolu v *Z. rouxii*. Tento kmen je nositelem dvou funkčních přenašečů, z nichž pouze jeden je reprimován fruktosou jako zdrojem uhlíku (*ZrSTL1*). Druhý ze zmíněných přenašečů, tedy *ZrStl2*, je pouze minimálně ovlivňován vnějšími vlivy, jeho produkce je víceméně stabilní a plní tak úlohu jakéhosi „housekeepingového“ transportéru glycerolu. Navíc, v případě jeho delece se objeví další, prozatím neznámý přenašeč, který sice transportuje glycerol s mnohem nižší afinitou, ale kapacita jeho přenosu je násobně vyšší. Velký přínos této práce také spočívá ve skutečnosti, že došlo k vyvrácení dříve akceptovaného názoru, že glycerol je v *Z. rouxii* transportován v symportu s Na^+ . Provedené experimenty jednoznačně potvrzují, že se jedná o symport s H^+ , podobně jako v případě *S. cerevisiae*.

I přestože geny kódující přenašeč glycerolu *ScStl1*, glycerolový kanál *ScFps1* a terminální kinasu dráhy HOG *ScHog1*, byly v minulosti velice detailně studovány, publikace č. 2 předkládané dizertační práce přináší nové, doposud nepublikované poznatky, týkající se jejich vlivu na metabolismus *S. cerevisiae*. V převážné části experimentů prováděných v rámci této dizertační práce byly využívány kmeny odvozené od *S. cerevisiae* W303 a to především z důvodu snazší manipulace a rychlejšího růstu. Je však známo, že oba hojně využívané laboratorní kmeny, tedy BY4741 a W303 se značně liší co do svých fyziologických vlastností a tedy i výsledky získané pro jeden kmen nemusí platit pro druhý (Petrezselyova *et al.*, 2010). Z tohoto důvodu byly v rámci předkládané práce konstruovány dvě unikátní série mutantních kmenů odvozených od laboratorních kmenů *S. cerevisiae* BY4741 a W303, postrádající geny *ScSTL1*, *ScFPS1* a popřípadě *ScHOG1* v různých kombinacích. Správnost takto komplexního přístupu byla potvrzena v Publikaci č. 2, kde bylo zjištěno, že v případě BY4741 není gen *ScSTL1* plně reprimován glukosou, jak bylo publikováno v případě kmene W303 (Ferreira *et al.*, 2005). Monitorováním vnitrobuněčného pH (pH_{in}) buněk rostlých v médiu s 2 % glukosy bylo zjištěno, že nepřítomnost *ScSTL1* způsobí zvýšení pH_{in} bez ohledu na další mutace. Současně byla také potvrzena lokalizace proteinu *ScStl1*-GFP v plasmatické membráně.

V rukopise č.1, tedy studii zabývající se vlivem heterologní exprese genu *ZrSTL1* na růst buněk *S. cerevisiae* v přítomnosti manitolu jako zdroje uhlíku, bylo naopak prokázáno, že druh použitého kmene nemá vliv na výsledné chování. Zlepšení růstu bylo zaznamenáno jak v případě kmene W303, tak v případě BY4741 exprimujícího gen *ZrSTL1*. V rámci této studie

bylo mimo jiné zjištěno, že přenašeč *ZrStl1* je ve své funkci schopen plně zastoupit *ScStl1*, tedy transportovat glycerol do buněk *S. cerevisiae* (odvozených od W303) se stejnou afinitou a kapacitou, jsou-li pěstovány na nefermentovatelném zdroji uhlíku. Získaná data mohou sloužit jako dobrý základ pro zdokonalování průmyslových kvasinkových kmenů využívaných například při výrobě bioetanolu z manitolu.

Kapitola nepublikovaných výsledků (Kapitola 4.5) se zabývá charakterizací jednoho z osmi možných glycerolových přenašečů kvasinky *D. hansenii*. I přestože nedošlo k potvrzení, že gen *DhSTL2* skutečně přenáší glycerol v buňkách *D. hansenii*, získané výsledky jednoznačně potvrzují nutnost využití více přístupů v případě charakterizace genů heterologní expresí.

6. Seznam použitých zkratk

aa	aminokyseliny
ADP	adenosindifosfát
Amp ^R	gen udělující resistenci k antibiotiku ampicilinu
ARS	autonomně se replikující sekvence
ATCC	americká kolekce typových kultur
ATP	adenosintrifosfát
bp	páry bazí
CBS	nizozemská centrální databáze houbových kultur
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	1,4-dithiotreitol
ESR	Environmental Stress Response
GFP	zelený fluorescenční protein
HOG	signální dráha odpovědi na hyperosmotický stres
MAPK	mitogenně aktivovaná protein kinasová dráha
MAT	párovací lokus
nt	nukleotidy
ori	počátek replikace
PCR	polymerasová řetězcová reakce
P	promotor
qRT-PCR	kvantitativní polymerasová řetězcová reakce

RNA ribonukleová kyselina

STRE stress response element

^T terminátor

TMD transmembránová doména

7. Seznam použité literatury

- Abadias, M., N. Teixido, J. Usall, I. Vinas & N. Magan, (2001) Improving water stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* grown in molasses-based media by physiological manipulation. *Can J Microbiol* **47**: 123-129.
- Adler, L., A. Blomberg & A. Nilsson, (1985) Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Bacteriol* **162**: 300-306.
- Adler, L. & L. Gustafsson, (1980) Polyhydric alcohol production and intracellular amino-acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Arch Microbiol* **124**: 123-130.
- Adrover, M.A., Z. Zi, A. Duch, J. Schaber, A. Gonzalez-Novo, J. Jimenez, M. Nadal-Ribelles, J. Clotet, E. Klipp & F. Posas, (2011) Time-dependent quantitative multicomponent control of the G(1)-S network by the stress-activated protein kinase Hog1 upon osmossress. *Sci Signal* **4**: ra63.
- Aggarwal, M., P.K. Bansal & A.K. Mondal, (2005) Molecular cloning and biochemical characterization of a 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase from *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **22**: 457-470.
- Aggarwal, M., K.V. Kishan & A.K. Mondal, (2008) Creation of salt-insensitive 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase by modeling and mutagenesis approach. *Arch Biochem Biophys* **469**: 174-183.
- Ahmadpour, D., C. Geijer, M.J. Tamas, K. Lindkvist-Petersson & S. Hohmann, (2014) Yeast reveals unexpected roles and regulatory features of aquaporins and aquaglyceroporins. *BBA* **1840**: 1482-1491.
- Albertyn, J., S. Hohmann, J.M. Thevelein & B.A. Prior, (1994) *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **14**: 4135-4144.
- Almagro, A., C. Prista, B. Benito, M.C. Loureiro-Dias & J. Ramos, (2001) Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Bacteriol* **183**: 3251-3255.
- Andre, B., (1995) An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**: 1575-1611.
- Andre, L., A. Hemming & L. Adler, (1991) Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae* - studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *FEBS Lett* **286**: 13-17.
- Andreishcheva, E.N., E.P. Isakova, N.N. Sidorov, N.B. Abramova, N.A. Ushakova, G.L. Shaposhnikov, M.I. Soares & R.A. Zvyagilskaya, (1999) Adaptation to salt stress in a salt-tolerant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochem* **64**: 1061-1067.
- Ansell, R., K. Granath, S. Hohmann, J.M. Thevelein & L. Adler, (1997) The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J* **16**: 2179-2187.
- Aoki, T. & K. Uchida, (1991) Amino acids-uptake deficient mutants of *Zygosaccharomyces rouxii* with altered production of higher alcohols. *Agr Biol Chem Tokyo* **55**: 2893-2894.
- Araki, H., A. Jearnpipatkul, H. Tatsumi, T. Sakurai, K. Ushio, T. Muta & Y. Oshima, (1985) Molecular and functional organization of yeast plasmid pSR1. *J Mol Biol* **182**: 191-203.

- Arino, J., J. Ramos & H. Sychrova, (2010) Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 95-120.
- Arx, J.A.v., L. Rodrigues de Miranda, M.T. Smith & D. Yarrow, (1977) The genera of yeasts and the yeast-like fungi. *Stud Mycol* **14**: 1 - 42.
- Bansal, P.K. & A.K. Mondal, (2000) Isolation and sequence of the *HOG1* homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the *hog1Δ* strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 81-88.
- Barnett, J.A., R.W. Payne & D. Yarrow, (2000) *Yeasts: Characteristics and Identification*, p. 1139. Cambridge University Press, Cambridge.
- Beese-Sims, S.E., J. Lee & D.E. Levin, (2011) Yeast Fps1 glycerol facilitator functions as a homotetramer. *Yeast* **28**: 815-819.
- Beese-Sims, S.E., S.J. Pan, J. Lee, E. Hwang-Wong, B.P. Cormack & D.E. Levin, (2012) Mutants in the *Candida glabrata* glycerol channels are sensitized to cell wall stress. *Eukaryot Cell* **11**: 1512-1519.
- Beese, S.E., T. Negishi & D.E. Levin, (2009) Identification of positive regulators of the yeast Fps1 glycerol channel. *PLoS Genet* **5**: e1000738.
- Berry, D.B., Q. Guan, J. Hose, S. Haroon, M. Gebbia, L.E. Heisler, C. Nislow, G. Giaever & A.P. Gasch, (2011) Multiple means to the same end: the genetic basis of acquired stress resistance in yeast. *PLoS Genet* **7**: e1002353.
- Bewley, G.C., J.L. Cook, S. Kusakabe, T. Mukai, D.L. Rigby & G.K. Chambers, (1989) Sequence, structure and evolution of the gene coding for sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* **17**: 8553-8567.
- Bicknell, A.A., J. Tourtellotte & M. Niwa, (2010) Late phase of the endoplasmic reticulum stress response pathway is regulated by Hog1 MAP kinase. *J Biol Chem* **285**: 17545-17555.
- Bill, R.M., K. Hedfalk, S. Karlgren, J.G. Mullins, J. Rydstrom & S. Hohmann, (2001) Analysis of the pore of the unusual major intrinsic protein channel, yeast Fps1p. *J Biol Chem* **276**: 36543-36549.
- Bilsland, E., C. Molin, S. Swaminathan, A. Ramne & P. Sunnerhagen, (2004) Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol* **53**: 1743-1756.
- Blomberg, A. & L. Adler, (1989) Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **171**: 1087-1092.
- Blomberg, A. & L. Adler, (1992) Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol* **33**: 145-212.
- Borodina, I. & J. Nielsen, (2014) Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. *Biotechnol J* **9**: 609-620.
- Bosson, R., M. Jaquenoud & A. Conzelmann, (2006) *GUP1* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an O-acyltransferase involved in remodeling of the GPI anchor. *Mol Biol Cell* **17**: 2636-2645.
- Bouwman, J., J. Kiewiet, A. Lindenbergh, K. van Eunen, M. Siderius & B.M. Bakker, (2011) Metabolic regulation rather than de novo enzyme synthesis dominates the osmo-adaptation of yeast. *Yeast* **28**: 43-53.
- Boyer, P.D., (1997) The ATP synthase-a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* **66**: 717-749.
- Breuer, U. & H. Harms, (2006) *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* **23**: 415-437.
- Brewster, J.L., T. de Valoir, N.D. Dwyer, E. Winter & M.C. Gustin, (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**: 1760-1763.

- Brewster, J.L. & M.C. Gustin, (2014) Hog1: 20 years of discovery and impact. *Sci Signal* **7**: re7.
- Brown, A.D., (1976) Microbial water stress. *Bacteriol Rev* **40**: 803-846.
- Brown, A.D., (1978) Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Adv Microb Physiol* **17**: 181-242.
- Casal, M., S. Paiva, R.P. Andrade, C. Gancedo & C. Leao, (1999) The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by *JEN1*. *J Bacteriol* **181**: 2620-2623.
- Causton, H.C., B. Ren, S.S. Koh, C.T. Harbison, E. Kanin, E.G. Jennings, T.I. Lee, H.L. True, E.S. Lander & R.A. Young, (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* **12**: 323-337.
- Coons, D.M., R.B. Boulton & L.F. Bisson, (1995) Computer-assisted nonlinear-regression analysis of the multicomponent glucose-uptake kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **177**: 3251-3258.
- Costenoble, R., H. Valadi, L. Gustafsson, C. Niklasson & C.J. Franzen, (2000) Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 1483-1495.
- Csonka, L.N. & A.D. Hanson, (1991) Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol* **45**: 569-606.
- Cunningham, K.W. & G.R. Fink, (1994) Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking *PMCI*, a homolog of plasma membrane Ca^{2+} ATPases. *J Cell Biol* **124**: 351-363.
- Dacosta, M.S. & D.J. Niederpruem, (1980) Temporal accumulation of mannitol and arabitol in *Geotrichum candidum*. *Arch Microbiol* **126**: 57-64.
- Dakal, T.C., L. Solieri & P. Giudici, (2014) Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Int J Food Microbiol* **185**: 140-157.
- Daran-Lapujade, P., J.M. Daran, M.A. Luttik, M.J. Almering, J.T. Pronk & P. Kotter, (2009) An atypical *PMR2* locus is responsible for hypersensitivity to sodium and lithium cations in the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D. *FEMS Yeast Res* **9**: 789-792.
- Davenport, K.D., K.E. Williams, B.D. Ullmann & M.C. Gustin, (1999) Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* filamentation/invasion pathway by osmotic stress in high-osmolarity glycogen pathway mutants. *Genetics* **153**: 1091-1103.
- de Miranda, L.R., K.R. Appel & M. Seyfarth, (1980) *Pichia sorbitofila* sp. nov. *Ant Leeuw* **46**: 157-159.
- de Montigny, J., C. Spehner, J. Souciet, F. Tekaia, B. Dujon, P. Wincker, F. Artiguenave & S. Potier, (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 15. *Pichia sorbitophila*. *FEBS Lett* **487**: 87-90.
- de Nadal, E., G. Ammerer & F. Posas, (2011) Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet* **12**: 833-845.
- DeLuna, A., M. Springer, M.W. Kirschner & R. Kishony, (2010) Need-based up-regulation of protein levels in response to deletion of their duplicate genes. *PLoS Biol* **8**: e1000347.
- Dihazi, H., R. Kessler & K. Eschrich, (2004) High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. *J Biol Chem* **279**: 23961-23968.
- Dujon, B., (2010) Yeast evolutionary genomics. *Nature reviews. Genetics* **11**: 512-524.
- Eberhardt, I. & S. Hohmann, (1995) Strategy for deletion of complete open reading frames in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **27**: 306-308.
- Edgley, M. & A.D. Brown, (1978) Response of xero-tolerant and non-tolerant yeasts to water stress. *J Gen Microbiol* **104**: 343-345.

- Elion, E.A., M. Qi & W. Chen, (2005) Signal transduction. Signaling specificity in yeast. *Science* **307**: 687-688.
- Emmerich, W. & F. Radler, (1983) The anaerobic metabolism of glucose and fructose by *Saccharomyces bailii*. *J Gen Microbiol* **129**: 3311-3318.
- Erasmus, D.J., G.K. van der Merwe & H.J. van Vuuren, (2003) Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Res* **3**: 375-399.
- Eriksson, P., L. Andre, R. Ansell, A. Blomberg & L. Adler, (1995) Cloning and characterization of *GPD2*, a second gene encoding sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison with *GPD1*. *Mol Microbiol* **17**: 95-107.
- Escote, X., M. Zapater, J. Clotet & F. Posas, (2004) Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat Cell Biol* **6**: 997-1002.
- Estruch, F., (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 469-486.
- Ferea, T.L., D. Botstein, P.O. Brown & R.F. Rosenzweig, (1999) Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. *Proc Nat Acad Sci U S A* **96**: 9721-9726.
- Ferreira, C. & C. Lucas, (2007) Glucose repression over *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter gene *STL1* is overcome by high temperature. *FEBS Lett* **581**: 1923-1927.
- Ferreira, C., F. van Voorst, A. Martins, L. Neves, R. Oliveira, M.C. Kielland-Brandt, C. Lucas & A. Brandt, (2005) A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **16**: 2068-2076.
- Ferreira, T., A.B. Mason & C.W. Slayman, (2001) The yeast Pma1 proton pump: a model for understanding the biogenesis of plasma membrane proteins. *J Biol Chem* **276**: 29613-29616.
- Fischer, M., N. Schnell, J. Chattaway, P. Davies, G. Dixon & D. Sanders, (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* *CCH1* gene is involved in calcium influx and mating. *FEBS Lett* **419**: 259-262.
- Fleet, G.H. & M.A. Mian, (1987) The occurrence and growth of yeasts in dairy-products. *Int J Food Microbiol* **4**: 145-155.
- Fuhrmann, G.F. & B. Volker, (1993) Misuse of graphical analysis in nonlinear sugar transport kinetics by Eadie-Hofstee plots. *BBA* **1145**: 180-182.
- Gadd, G.M., J.A. Chudek, R. Foster & R.H. Reed, (1984) The osmotic responses of *Penicillium ochro-chloron* - Changes in internal solute levels in response to copper and salt stress. *J Gen Microbiol* **130**: 1969-1975.
- Galcheva-Gargova, Z., B. Derijard, I.H. Wu & R.J. Davis, (1994) An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* **265**: 806-808.
- Gancedo, C., J.M. Gancedo & A. Sols, (1968) Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production. *Eur J Biochem* **5**: 165-172.
- Gancedo, C., A. Llobell, J.C. Ribas & F. Luchi, (1986) Isolation and characterization of mutants from *Schyzosaccharomyces pombe* defective in glycerol catabolism. *Eur J Biochem* **159**: 171-174.
- Garcia, M.J., G. Rios, R. Ali, J.M. Belles & R. Serrano, (1997) Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol* **143**: 1125-1131.
- Gasch, A.P., (2007) Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast* **24**: 961-976.

- Gasch, A.P., P.T. Spellman, C.M. Kao, O. Carmel-Harel, M.B. Eisen, G. Storz, D. Botstein & P.O. Brown, (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**: 4241-4257.
- Gee, R., A. Goyal, R.U. Byerrum & N.E. Tolbert, (1993) Two isoforms of dihydroxyacetone phosphate reductase from the chloroplasts of *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol* **103**: 243-249.
- Goffeau, A., B.G. Barrell, H. Bussey, R.W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J.D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E.J. Louis, H.W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin & S.G. Oliver, (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-547.
- González-Hernández, J.c., (2010) Molecular cloning and characterization of *STL1* gene of *Debaryomyces hansenii*. *J Yeast Fungal Res* **1**: 62-72.
- Gori, K., M. Hebraud, C. Chambon, H.D. Mortensen, N. Arneborg & L. Jespersen, (2007) Proteomic changes in *Debaryomyces hansenii* upon exposure to NaCl stress. *FEMS Yeast Res* **7**: 293-303.
- Gorner, W., E. Durchschlag, M.T. Martinez-Pastor, F. Estruch, G. Ammerer, B. Hamilton, H. Ruis & C. Schuller, (1998) Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* **12**: 586-597.
- Graca, S., (2004) Salt stress response of the extremely halotolerant yeast *Candida halophila* (syn *versatilis*) CBS 4019 In: Department of Biology. Portugal: University of Minho
- Greene, J.R., N.H. Brown, B.J. DiDomenico, J. Kaplan & D.J. Eide, (1993) The *GEF1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron-limited growth. *Mol Gen Genet* **241**: 542-553.
- Guldener, U., S. Heck, T. Fielder, J. Beinhauer & J.H. Hegemann, (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519-2524.
- Hall, J.P., V. Cherkasova, E. Elion, M.C. Gustin & E. Winter, (1996) The osmoregulatory pathway represses mating pathway activity in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of a *FUS3* mutant that is insensitive to the repression mechanism. *Mol Cell Biol* **16**: 6715-6723.
- Han, J., J.D. Lee, L. Bibbs & R.J. Ulevitch, (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**: 808-811.
- Haro, R., B. Garciadeblas & A. Rodriguez-Navarro, (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* **291**: 189-191.
- Harrison, J.C., T.R. Zyla, E.S. Bardes & D.J. Lew, (2004) Stress-specific activation mechanisms for the "cell integrity" MAPK pathway. *J Biol Chem* **279**: 2616-2622.
- Hayashi, M. & T. Maeda, (2006) Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* **139**: 797-803.
- Hayashida, Y., K. Nishimura & J.C. Slaughter, (1997) The influence of mash pre-aging on the development of the flavour-active compound, 4-hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF), during soy sauce fermentation. *Int J Food Sci Tech* **32**: 11-14.
- Hedfalk, K., R.M. Bill, J.G. Mullins, S. Karlgren, C. Filipsson, J. Bergstrom, M.J. Tamas, J. Rydstrom & S. Hohmann, (2004) A regulatory domain in the C-terminal extension of the yeast glycerol channel Fps1p. *J Biol Chem* **279**: 14954-14960.
- Henderson, K.A., A.L. Hughes & D.E. Gottschling, (2014) Mother-daughter asymmetry of pH underlies aging and rejuvenation in yeast. *eLife* **3**: e03504.
- Hickman, M.J., D. Spatt & F. Winston, (2011) The Hog1 mitogen-activated protein kinase mediates a hypoxic response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **188**: 325-338.

- Hill, J.E., A.M. Myers, T.J. Koerner & A. Tzagoloff, (1986) Yeast *Escherichia coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**: 163-167.
- Hirayama, T., T. Maeda, H. Saito & K. Shinozaki, (1995) Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **249**: 127-138.
- Hoffman, C.S. & F. Winston, (1987) A 10-Minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272.
- Hofmann, K.H. & W. Babel, (1980) Dihydroxyacetone kinase of methanol-assimilating yeast. I. Regulation of dihydroxyacetone kinase from *Candida methylca* in situ. *Z Allg Mikrobiol* **20**: 389-398.
- Hohmann, S., (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372.
- Hohmann, S., (2009) Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **583**: 4025-4029.
- Hohmann, S., M. Krantz & B. Nordlander, (2007) Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol* **428**: 29-45.
- Hohmann, S. & W.H. Mager, (2003) *Yeast stress response*, p. 389. Springer.
- Holst, B., C. Lunde, F. Lages, R. Oliveira, C. Lucas & M.C. Kielland-Brandt, (2000) *GUP1* and its close homologue *GUP2*, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **37**: 108-124.
- Hootmann, U., B. Bisping & H.J. Rehm, (1991) Physiology of polyol formation by free and immobilized cells of the osmotolerant yeast *Pichia farinosa*. *Appl Microbiol Biot* **35**: 258-263.
- Hopkinson, D.A., J. Peters & H. Harris, (1974) Rare electrophoretic variants of glycerol-3-phosphate dehydrogenase: evidence for two structural gene loci (*GPD1* and *GPD2*). *Annu Hum Genet* **37**: 477-484.
- Horak, J., (2013) Regulations of sugar transporters: insights from yeast. *Curr Genet* **59**: 1-31.
- Huang, L.S., H.K. Doherty & I. Herskowitz, (2005) The Smk1p MAP kinase negatively regulates Gsc2p, a 1,3-beta-glucan synthase, during spore wall morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12431-12436.
- Chen, R.E. & J. Thorner, (2007) Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BBA* **1773**: 1311-1340.
- Chujo, M., S. Yoshida, A. Ota, K. Murata & S. Kawai, (2015) Acquisition of the ability to assimilate mannitol by *Saccharomyces cerevisiae* through dysfunction of the general corepressor Tup1-Cyc8. *Appl Environ Microbiol* **81**: 9-16.
- Iwaki, T., S. Kurono, Y. Yokose, K. Kubota, Y. Tamai & Y. Watanabe, (2001) Cloning of glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes (*ZrGPD1* and *ZrGPD2*) and glycerol dehydrogenase genes (*ZrGCV1* and *ZrGCV2*) from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Yeast* **18**: 737-744.
- Iwaki, T., Y. Tamai & Y. Watanabe, (1999) Two putative MAP kinase genes, *ZrHOG1* and *ZrHOG2*, cloned from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* are functionally homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* *HOG1* gene. *Microbiol* **145**: 241-248.
- Jauniaux, J.C. & M. Grenson, (1990) *GAP1*, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. *Eur J Biochem* **190**: 39-44.
- Johnson, E.A., (2013) Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts-the basidiomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 7563-7577.

- Jung, U.S. & D.E. Levin, (1999) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* **34**: 1049-1057.
- Kane, P.M. & K.J. Parra, (2000) Assembly and regulation of the yeast vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase. *J Exp Biol* **203**: 81-87.
- Kapteyn, J.C., B. ter Riet, E. Vink, S. Blad, H. De Nobel, H. Van Den Ende & F.M. Klis, (2001) Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* **39**: 469-479.
- Kato, T., Jr., K. Okazaki, H. Murakami, S. Stettler, P.A. Fantes & H. Okayama, (1996) Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS Lett* **378**: 207-212.
- Kayingo, G., A. Martins, R. Andrie, L. Neves, C. Lucas & B. Wong, (2009) A permease encoded by *STL1* is required for active glycerol uptake by *Candida albicans*. *Microbiol* **155**: 1547-1557.
- Kinclova-Zimmermannova, O., M. Zavrel & H. Sychrova, (2005) Identification of conserved prolyl residue important for transport activity and the substrate specificity range of yeast plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporters. *J Biol Chem* **280**: 30638-30647.
- Kinclova, O., J. Ramos, S. Potier & H. Sychrova, (2001) Functional study of the *Saccharomyces cerevisiae* Nha1p C-terminus. *Mol Microbiol* **40**: 656-668.
- Klipp, E., B. Nordlander, R. Kruger, P. Gennemark & S. Hohmann, (2005) Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. *Nat Biotechnol* **23**: 975-982.
- Kong, Y.C., J.W. May & J.H. Marshall, (1985) Glycerol oxidation and triose reduction by pyridine nucleotide-linked enzymes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Gen Microbiol* **131**: 1571-1579.
- Krantz, M., D. Ahmadpour, L.G. Ottosson, J. Warringer, C. Waltermann, B. Nordlander, E. Klipp, A. Blomberg, S. Hohmann & H. Kitano, (2009) Robustness and fragility in the yeast high osmolarity glycerol (HOG) signal-transduction pathway. *Mol Syst Biol* **5**: 281.
- Krantz, M., B. Nordlander, H. Valadi, M. Johansson, L. Gustafsson & S. Hohmann, (2004) Anaerobicity prepares *Saccharomyces cerevisiae* cells for faster adaptation to osmotic shock. *Eukaryot Cell* **3**: 1381-1390.
- Kurtzman, C.P., (1990) DNA relatedness among species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Yeast* **6**: 213-219.
- Kurtzman, C.P., J.W. Fell & T. Boekhout, (2010) *The Yeast: A Taxonomic study*. Elsevier.
- Lages, F. & C. Lucas, (1995) Characterization of a glycerol/H⁺ symport in the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila*. *Yeast* **11**: 111-119.
- Lages, F. & C. Lucas, (1997) Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *BBA* **1322**: 8-18.
- Lages, F., M. Silva-Graca & C. Lucas, (1999) Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiol* **145** (Pt 9): 2577-2585.
- Larsson, C. & L. Gustafsson, (1987) Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* during salt stress. *Arch Microbiol* **147**: 358-363.
- Larsson, C., C. Morales, L. Gustafsson & L. Adler, (1990) Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J Bacteriol* **172**: 1769-1774.
- Larsson, K., R. Ansell, P. Eriksson & L. Adler, (1993) A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **10**: 1101-1111.

- Lawrence, C.L., C.H. Botting, R. Antrobus & P.J. Coote, (2004) Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in yeast: regulating adaptation to citric acid stress. *Mol Cell Biol* **24**: 3307-3323.
- Leandro, M.J., S. Cabral, C. Prista, M.C. Loureiro-Dias & H. Sychrova, (2014) The high-capacity specific fructose facilitator ZrFfz1 is essential for the fructophilic behavior of *Zygosaccharomyces rouxii* CBS 732^T. *Eukaryot Cell* **13**: 1371-1379.
- Leandro, M.J., C. Fonseca & P. Goncalves, (2009) Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. *FEMS Yeast Res* **9**: 511-525.
- Leandro, M.J., H. Sychrova, C. Prista & M.C. Loureiro-Dias, (2011) The osmotolerant fructophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii* employs two plasma-membrane fructose uptake systems belonging to a new family of yeast sugar transporters. *Microbiol* **157**: 601-608.
- Levin, D.E., (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 262-291.
- Levin, D.E., (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**: 1145-1175.
- Liong, M.T., (2011) *Probiotics: Biology, Genetics and Health Aspects*. Springer Berlin Heidelberg.
- Liu, X., U.H. Mortensen & M. Workman, (2013) Expression and functional studies of genes involved in transport and metabolism of glycerol in *Pachysolen tannophilus*. *Microb Cell Fact* **12**: 27.
- Lodish, H., A. Berk, C. Kaiser, A., M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon & M. Scott, P., (2012) *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, New York.
- Louis, V.L., L. Despons, A. Friedrich, T. Martin, P. Durrens, S. Casaregola, C. Neuveglise, C. Fairhead, C. Marck, J.A. Cruz, M.L. Straub, V. Kugler, C. Sacerdot, Z. Uzunov, A. Thierry, S. Weiss, C. Bleykasten, J. De Montigny, N. Jacques, P. Jung, M. Lemaire, S. Mallet, G. Morel, G.F. Richard, A. Sarkar, G. Savel, J. Schacherer, M.L. Seret, E. Talla, G. Samson, C. Jubin, J. Poulain, B. Vacherie, V. Barbe, E. Pelletier, D.J. Sherman, E. Westhof, J. Weissenbach, P.V. Baret, P. Wincker, C. Gaillardin, B. Dujon & J.L. Souciet, (2012) *Pichia sorbitophila*, an interspecies yeast hybrid, reveals early steps of genome resolution after polyploidization. *G3* **2**: 299-311.
- Lucas, C., M. Dacosta & N. Van Uden, (1990) Osmoregulatory active sodium-glycerol cotransport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* **6**: 187-191.
- Luxo, C., M.F. Nobre & M.S. Dacosta, (1993) Intracellular polyol accumulation by yeast like fungi of the genera *Geotrichum* and *Endomyces* in response to water-stress (NaCl). *Can J Microbiol* **39**: 868-873.
- Macia, J., S. Regot, T. Peeters, N. Conde, R. Sole & F. Posas, (2009) Dynamic signaling in the Hog1 MAPK pathway relies on high basal signal transduction. *Sci Signal* **2**: ra13.
- Maeda, T., A.Y. Tsai & H. Saito, (1993) Mutations in a protein tyrosine phosphatase gene (*PTP2*) and a protein serine/threonine phosphatase gene (*PTCI*) cause a synthetic growth defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**: 5408-5417.
- Mager, W.H. & A.J. De Kruijff, (1995) Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rew* **59**: 506-531.
- Maresova, L., B. Hoskova, E. Urbankova, R. Chaloupka & H. Sychrova, (2010) New applications of pHluorin-measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast* **27**: 317-325.
- Maresova, L. & H. Sychrova, (2003) Physiological characterization of osmotolerant yeast *Pichia sorbitophila* and comparison with a putative synonym *Pichia farinosa*. *Folia Microbiol* **48**: 211-217.

- Martin, H., M. Flandez, C. Nombela & M. Molina, (2005) Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol Microbiol* **58**: 6-16.
- Mattanovich, D., M. Sauer & B. Gasser, (2014) Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. *Microb Cell Fact* **13**: 34.
- Mattison, C.P. & I.M. Ota, (2000) Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes Dev* **14**: 1229-1235.
- May, J.W. & J. Sloan, (1981) Glycerol utilization by *Schizosaccharomyces pombe* - Dehydrogenation as the initial step. *J Gen Microbiol* **123**: 183-185.
- McClean, M.N., A. Mody, J.R. Broach & S. Ramanathan, (2007) Cross-talk and decision making in MAP kinase pathways. *Nat Genet* **39**: 409-414.
- Meikle, A.J., J.A. Chudek, R.H. Reed & G.M. Gadd, (1991) Natural abundance ^{13}C -nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of acyclic polyol and trehalose accumulation by several yeast species in response to salt stress. *FEMS Microbiol Lett* **66**: 163-167.
- Melamed, D., L. Pnueli & Y. Arava, (2008) Yeast translational response to high salinity: global analysis reveals regulation at multiple levels. *RNA* **14**: 1337-1351.
- Merlini, L., O. Dudin & S.G. Martin, (2013) Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open Biol* **3**: 130008.
- Mollapour, M. & P.W. Piper, (2007) Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Mol Cell Biol* **27**: 6446-6456.
- Montiel, V. & J. Ramos, (2007) Intracellular Na^+ and K^+ distribution in *Debaryomyces hansenii*. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of *DhNHX1*. *FEMS Yeast Res* **7**: 102-109.
- Mortimer, R.K. & J.R. Johnston, (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**: 35-43.
- Mounier, J., R. Gelsomino, S. Goerges, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, S. Scherer, J. Swings, G.F. Fitzgerald & T.M. Cogan, (2005) Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6489-6500.
- Moye-Rowley, W.S., (2002) Transcription factors regulating the response to oxidative stress in yeast. *Antioxid Redox Signal* **4**: 123-140.
- Muzzey, D., C.A. Gomez-Urbe, J.T. Mettetal & A. van Oudenaarden, (2009) A systems-level analysis of perfect adaptation in yeast osmoregulation. *Cell* **138**: 160-171.
- Nass, R., K.W. Cunningham & R. Rao, (1997) Intracellular sequestration of sodium by a novel Na^+/H^+ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H^+ -ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J Biol Chem* **272**: 26145-26152.
- Nelissen, B., R. De Wachter & A. Goffeau, (1997) Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 113-134.
- Neves, L., F. Lages & C. Lucas, (2004a) New insights on glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **565**: 160-162.
- Neves, L., R. Oliveira & C. Lucas, (2004b) Yeast orthologues associated with glycerol transport and metabolism. *FEMS Yeast Res* **5**: 51-62.
- Nevoigt, E. & U. Stahl, (1997) Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **21**: 231-241.
- Nielsen, J. & M.C. Jewett, (2008) Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **8**: 122-131.

- Nilsson, A. & L. Adler, (1990) Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *BBA* **1034**: 180-185.
- Norbeck, J. & A. Blomberg, (1997) Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J Biol Chem* **272**: 5544-5554.
- Norbeck, J., A.K. Pahlman, N. Akhtar, A. Blomberg & L. Adler, (1996) Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding *GPP1* and *GPP2* genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **271**: 13875-13881.
- Norkrans, B. & A. Kylin, (1969) Regulation of the potassium to sodium ratio and of the osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *J Bacteriol* **100**: 836-845.
- Nozawa, A., J. Takano, M. Kobayashi, N. von Wiren & T. Fujiwara, (2006) Roles of *BOR1*, *DUR3*, and *FPS1* in boron transport and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **262**: 216-222.
- O'Rourke, S.M. & I. Herskowitz, (1998) The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**: 2874-2886.
- O'Rourke, S.M., I. Herskowitz & E.K. O'Shea, (2002) Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Genet* **18**: 405-412.
- Ohmiya, R., H. Yamada, K. Nakashima, H. Aiba & T. Mizuno, (1995) Osmoregulation of fission yeast: cloning of two distinct genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase, one of which is responsible for osmotolerance for growth. *Mol Microbiol* **18**: 963-973.
- Ohshiro, K. & T. Yagi, (1996) Regulation of intracellular osmotic pressure and some factors that influence the promotion of glycerol synthesis in a respiration-deficient mutant of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* during salt stress. *J Gen Appl Microbiol* **42**: 201-212.
- Oliveira, R., F. Lages, M. Silva-Graca & C. Lucas, (2003) Fps1p channel is the mediator of the major part of glycerol passive diffusion in *Saccharomyces cerevisiae*: artefacts and re-definitions. *BBA* **1613**: 57-71.
- Oliveira, R. & C. Lucas, (2004) Expression studies of *GUP1* and *GUP2* genes involved in glycerol active transport in *Saccharomyces cerevisiae*, using semi-quantitative RT-PCR. *Curr Genet* **46**: 140-146.
- Olz, R., K. Larsson, L. Adler & L. Gustafsson, (1993) Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress. *J Bacteriol* **175**: 2205-2213.
- Onishi, H., (1963) Osmophilic Yeasts. *Adv Food Res* **12**: 53-94.
- Pahlman, A.K., K. Granath, R. Ansell, S. Hohmann & L. Adler, (2001) The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem* **276**: 3555-3563.
- Palma, M., A. Goffeau, I. Spencer-Martins & P.V. Baret, (2007) A phylogenetic analysis of the sugar porters in hemiascomycetous yeasts. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**: 241-248.
- Panadero, J., C. Pallotti, S. Rodriguez-Vargas, F. Randez-Gil & J.A. Prieto, (2006) A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway,

- which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 4638-4645.
- Panwar, S.L., R. Pasrija & R. Prasad, (2008) Membrane homeostasis and multidrug resistance in yeast. *Biosci Rep* **28**: 217-228.
- Pao, S.S., I.T. Paulsen & M.H. Saier, Jr., (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1-34.
- Papouskova, K. & H. Sychrova, (2007) The co-action of osmotic and high temperature stresses results in a growth improvement of *Debaryomyces hansenii* cells. *Int J Food Microbiol* **118**: 1-7.
- Parekh, S.R. & N.K. Pandey, (1985) Production of glycerol by *Hansenula anomala*. *Biotechnol Bioeng* **27**: 1089-1091.
- Pelet, S., F. Rudolf, M. Nadal-Ribelles, E. de Nadal, F. Posas & M. Peter, (2011) Transient activation of the HOG MAPK pathway regulates bimodal gene expression. *Science* **332**: 732-735.
- Pereira, I., A. Madeira, C. Prista, M.C. Loureiro-Dias & M.J. Leandro, (2014) Characterization of new polyol/H⁽⁺⁾ symporters in *Debaryomyces hansenii*. *PLoS One* **9**: e88180.
- Petersen, K.M. & L. Jespersen, (2004) Genetic diversity of the species *Debaryomyces hansenii* and the use of chromosome polymorphism for typing of strains isolated from surface-ripened cheeses. *J Appl Microbiol* **97**: 205-213.
- Petrezselyova, S., J. Zahradka & H. Sychrova, (2010) *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 and W303-1A laboratory strains differ in salt tolerance. *Fungal Biol* **114**: 144-150.
- Petrovic, U., N. Gunde-Cimerman & A. Plemenitas, (2002) Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Mol Microbiol* **45**: 665-672.
- Pettersson, N., C. Filipsson, E. Becit, L. Brive & S. Hohmann, (2005) Aquaporins in yeasts and filamentous fungi. *Biol Cell* **97**: 487-500.
- Philips, J. & I. Herskowitz, (1997) Osmotic balance regulates cell fusion during mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **138**: 961-974.
- Posas, F., J.R. Chambers, J.A. Heyman, J.P. Hoeffler, E. de Nadal & J. Arino, (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* **275**: 17249-17255.
- Posas, F. & H. Saito, (1998) Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J* **17**: 1385-1394.
- Posas, F., S.M. Wurgler Murphy, T. Maeda, E.A. Witten, T.C. Thai & H. Saito, (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**: 865-875.
- Pribylova, L., J. de Montigny & H. Sychrova, (2007a) Osmoresistant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*: the two most studied wild-type strains (ATCC 2623 and ATCC 42981) differ in osmotolerance and glycerol metabolism. *Yeast* **24**: 171-180.
- Pribylova, L., J. de Montigny & H. Sychrova, (2007b) Tools for the genetic manipulation of *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEMS Yeast Res* **7**: 1285-1294.
- Pribylova, L., V. Farkas, I. Slaninova, J. de Montigny & H. Sychrova, (2007c) Differences in osmotolerant and cell-wall properties of two *Zygosaccharomyces rouxii* strains. *Folia Microbiol* **52**: 241-245.
- Pribylova, L., K. Papouskova & H. Sychrova, (2008) The salt tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* possesses two plasma-membrane Na⁺/H⁺-antiporters (ZrNha1p and ZrSod2-22p) playing different roles in cation homeostasis and cell physiology. *Fungal Genet Biol* **45**: 1439-1447.

- Pribylova, L., M.L. Straub, H. Sychrova & J. de Montigny, (2007d) Characterisation of *Zygosaccharomyces rouxii* centromeres and construction of first *Z.rouxii* centromeric vectors. *Chromosome Res* **15**: 439-445.
- Pribylova, L. & H. Sychrova, (2003) Efficient transformation of the osmotolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* by electroporation. *J Microbiol Methods* **55**: 481-484.
- Prior, C., S. Potier, J.L. Souciet & H. Sychrova, (1996) Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na⁺/H⁺-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **387**: 89-93.
- Prista, C., A. Almagro, M.C. LoureiroDias & J. Ramos, (1997) Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4005-4009.
- Proft, M., F.D. Gibbons, M. Copeland, F.P. Roth & K. Struhl, (2005) Genomewide identification of Sko1 target promoters reveals a regulatory network that operates in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**: 1343-1352.
- Proft, M. & K. Struhl, (2004) MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118**: 351-361.
- Protchenko, O., R. Rodriguez-Suarez, R. Androphy, H. Bussey & C.C. Philpott, (2006) A screen for genes of heme uptake identifies the FLC family required for import of FAD into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **281**: 21445-21457.
- Ramos, J., J. Arino & H. Sychrova, (2011) Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiol Lett* **317**: 1-8.
- Rep, M., M. Krantz, J.M. Thevelein & S. Hohmann, (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* **275**: 8290-8300.
- Ruis, H. & C. Schuller, (1995) Stress signaling in yeast. *Bioessays* **17**: 959-965.
- Saito, H., (2010) Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways. *Curr Opin Microbiol* **13**: 677-683.
- Saito, H. & F. Posas, (2012) Response to Hyperosmotic Stress. *Genetics* **192**: 289-318.
- Saito, H. & K. Tatebayashi, (2004) Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J Biochem* **136**: 267-272.
- San Jose, C., R.A. Monge, R. Perez-Diaz, J. Pla & C. Nombela, (1996) The mitogen-activated protein kinase homolog *HOG1* gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* **178**: 5850-5852.
- Serrano, R., (1978) Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem* **22**: 51-63.
- Serrano, R., (1983) In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett* **156**: 11-14.
- Shepherd, A. & P.W. Piper, (2010) The Fps1p aquaglyceroporin facilitates the use of small aliphatic amides as a nitrogen source by amidase-expressing yeasts. *FEMS Yeast Res* **10**: 527-534.
- Sherman, D.J., T. Martin, M. Nikolski, C. Cayla, J.L. Souciet, P. Durrens & G. Consortium, (2009) Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acids Res* **37**: D550-554.
- Schlessner, A., S. Ulaszewski, M. Ghislain & A. Goffeau, (1988) A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **263**: 19480-19487.
- Schmitt, A.P. & K. McEntee, (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5777-5782.
- Schwartz, M.A. & H.D. Madhani, (2004) Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* **38**: 725-748.

- Siderius, M., O. Van Wuytswinkel, K.A. Reijenga, M. Kelders & W.H. Mager, (2000) The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. *Mol Microbiol* **36**: 1381-1390.
- Silva-Graca, M., L. Neves & C. Lucas, (2003) Outlines for the definition of halotolerance/halophily in yeasts: *Candida versatilis* (*halophila*) CBS 4019 as the archetype? *FEMS Yeast Res* **3**: 347-362.
- Solieri, L., T.C. Dakal & S. Biccato, (2014) Quantitative phenotypic analysis of multistress response in *Zygosaccharomyces rouxii* complex. *FEMS Yeast Res* **14**: 586-600.
- Solieri, L., T.C. Dakal, M.A. Croce & P. Giudici, (2013) Unravelling genomic diversity of *Zygosaccharomyces rouxii* complex with a link to its life cycle. *FEMS Yeast Res* **13**: 245-258.
- Solieri, L. & P. Giudici, (2008) Yeasts associated to traditional balsamic vinegar: ecological and technological features. *Int J Food Microbiol* **125**: 36-45.
- Sotelo, J. & M.A. Rodriguez-Gabriel, (2006) Mitogen-activated protein kinase Hog1 is essential for the response to arsenite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **5**: 1826-1830.
- Soveral, G., C. Prista, T.F. Moura & M.C. Loureiro-Dias, (2011) Yeast water channels: an overview of orthodox aquaporins. *Biol Cell* **103**: 35-54.
- Spencer, J.F., A.L. Ragout de Spencer & C. Lalue, (2002) Non-conventional yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**: 147-156.
- Stratford, M., (2006) Food and Beverage Spoilage Yeasts. In: Yeasts in Food and Beverages. A. Querol & G. Fleet (eds). Springer Berlin Heidelberg, pp. 335-379.
- Stratford, M., H. Steels, G. Nebe-von-Caron, M. Novodvorska, K. Hayer & D.B. Archer, (2013) Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Int J Food Microbiol* **166**: 126-134.
- Stribny, J., O. Kinclova-Zimmermannova & H. Sychrova, (2012) Potassium supply and homeostasis in the osmotolerant non-conventional yeasts *Zygosaccharomyces rouxii* differ from *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **58**: 255-264.
- Suezawa, Y., M. Suzuki & H. Mori, (2008) Genotyping of a miso and soy sauce fermentation yeast, *Zygosaccharomyces rouxii*, based on sequence analysis of the partial 26S ribosomal RNA gene and two internal transcribed spacers. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 2452-2455.
- Sutherland, F.C.W., F. Lages, C. Lucas, K. Luyten, J. Albertyn, S. Hohmann, B.A. Prior & S.G. Kilian, (1997) Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**: 7790-7795.
- Suzuki, C. & Y.I. Shimma, (1999) P-type ATPase spf1 mutants show a novel resistance mechanism for the killer toxin SMKT. *Mol Microbiol* **32**: 813-823.
- Tamang, J.P. & K. Kailasapathy, (2010) *Fermented Foods and Beverages of the World*. CRC Press.
- Tamas, M.J., S. Karlgren, R.M. Bill, K. Hedfalk, L. Allegri, M. Ferreira, J.M. Thevelein, J. Rydstrom, J.G. Mullins & S. Hohmann, (2003) A short regulatory domain restricts glycerol transport through yeast Fps1p. *J Biol Chem* **278**: 6337-6345.
- Tamas, M.J., K. Luyten, F.C. Sutherland, A. Hernandez, J. Albertyn, H. Valadi, H. Li, B.A. Prior, S.G. Kilian, J. Ramos, L. Gustafsson, J.M. Thevelein & S. Hohmann, (1999) Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol Microbiol* **31**: 1087-1104.
- Tang, X.M., G. Kayingo & B.A. Prior, (2005) Functional analysis of the *Zygosaccharomyces rouxii* Fps1p homologue. *Yeast* **22**: 571-581.

- Tanigawa, M., A. Kihara, M. Terashima, T. Takahara & T. Maeda, (2012) Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **32**: 2861-2870.
- Tatebayashi, K., K. Tanaka, H.Y. Yang, K. Yamamoto, Y. Matsushita, T. Tomida, M. Imai & H. Saito, (2007) Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J* **26**: 3521-3533.
- Thome-Ortiz, P.E., A. Pena & J. Ramirez, (1998) Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast* **14**: 1355-1371.
- Thome, P.E., (2004) Isolation of a GPD gene from *Debaryomyces hansenii* encoding a glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *Yeast* **21**: 119-126.
- Thorsen, M., Y. Di, C. Tangemo, M. Morillas, D. Ahmadpour, C. Van der Does, A. Wagner, E. Johansson, J. Boman, F. Posas, R. Wysocki & M.J. Tamas, (2006) The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Mol Biol Cell* **17**: 4400-4410.
- Toh-E, A. & T. Oguchi, (2001) Defects in glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor synthesis activate Hog1 kinase and confer copper-resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet Syst* **76**: 393-410.
- Tokuoka, K. & T. Ishitani, (1991) Minimum water activities for the growth of yeasts isolated from high-sugar foods. *J Gen Appl Microbiol* **37**: 111-119.
- Tulha, J., A. Lima, C. Lucas & C. Ferreira, (2010) *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter Stl1p is essential for cold/near-freeze and freeze stress adaptation. A simple recipe with high biotechnological potential is given. *Microb Cell Fact* **9**: 82.
- Van Aelst, L., S. Hohmann, F.K. Zimmermann, A.W. Jans & J.M. Thevelein, (1991) A yeast homologue of the bovine lens fibre MIP gene family complements the growth defect of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant on fermentable sugars but not its defect in glucose-induced RAS-mediated cAMP signalling. *EMBO J* **10**: 2095-2104.
- Van Eck, J.H., B.A. Prior & E.V. Brandt, (1993) The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *J Gen Microbiol* **139**: 1047-1054.
- van Zyl, P.J., S.G. Kilian & B.A. Prior, (1990) The role of an active-transport mechanism in glycerol accumulation during osmoregulation by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Appl Microbiol Biotechnol* **34**: 231-235.
- van Zyl, P.J. & B.A. Prior, (1990) Water relations of polyol accumulation by *Zygosaccharomyces rouxii* in continuous culture. *Appl Microbiol Biot* **33**: 12-17.
- van Zyl, P.J., B.A. Prior & S.G. Kilian, (1991) Regulation of glycerol metabolism in *Zygosaccharomyces rouxii* in response to osmotic stress. *Appl Microbiol Biot* **36**: 369-374.
- Vardy, E., I.T. Arkin, K.E. Gottschalk, H.R. Kaback & S. Schuldiner, (2004) Structural conservation in the major facilitator superfamily as revealed by comparative modeling. *Protein Sci* **13**: 1832-1840.
- Vasiliadis, G.E., J. Sloan, J.H. Marshall & J.W. May, (1987) Glycerol and dihydroxyacetone metabolizing enzymes in fission yeasts of the genus *Schizosaccharomyces*. *Arch Microbiol* **147**: 263-267.
- Velkova, K. & H. Sychrova, (2006) The *Debaryomyces hansenii* *NHA1* gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. *Gene* **369**: 27-34.
- Vernet, T., D. Dignard & D.Y. Thomas, (1987) A family of yeast expression vectors containing the phage-F1 intergenic region. *Gene* **52**: 225-233.
- Voet, D., C.W. Pratt & J.G. Voet, (2012) *Principles of Biochemistry*. Wiley.

- Wallis, J.W., G. Chrebet, G. Brodsky, M. Rolfe & R. Rothstein, (1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* **58**: 409-419.
- Wang, Z.X., G. Kayingo, A. Blomberg & B.A. Prior, (2002) Cloning, sequencing and characterization of a gene encoding dihydroxyacetone kinase from *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL2547. *Yeast* **19**: 1447-1458.
- Warmka, J., J. Hanneman, J. Lee, D. Amin & I. Ota, (2001) Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol* **21**: 51-60.
- Watanabe, Y., M. Hirasaki, N. Tohnai, K. Yagi, S. Abe & Y. Tamai, (2003) Salt shock enhances the expression of *ZrATP2*, the gene for the mitochondrial ATPase beta subunit of *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Biosci Bioeng* **96**: 193-195.
- Watanabe, Y., M. Shiramizu & Y. Tamai, (1991) Molecular cloning and sequencing of plasma membrane H⁽⁺⁾-ATPase gene from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Biochem* **110**: 237-240.
- Watanabe, Y., S. Tsuchimoto & Y. Tamai, (2004) Heterologous expression of *Zygosaccharomyces rouxii* glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (*ZrGPD1*) and glycerol dehydrogenase gene (*ZrGCI1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **4**: 505-510.
- Westfall, P.J., J.C. Patterson, R.E. Chen & J. Thorner, (2008) Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 12212-12217.
- Wethered, J.M., E.C. Metcalf & D.H. Jennings, (1985) Carbohydrate metabolism in the fungus *Dendryphiella salina* .8. The Contribution of polyols and ions to the mycelial solute potential in relation to the external osmoticum. *New Phytol* **101**: 631-649.
- Widmann, C., S. Gibson, M.B. Jarpe & G.L. Johnson, (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**: 143-180.
- Wieczorke, R., S. Krampe, T. Weierstall, K. Freidel, C.P. Hollenberg & E. Boles, (1999) Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **464**: 123-128.
- Winkler, A., C. Arkind, C.P. Mattison, A. Burkholder, K. Knoche & I. Ota, (2002) Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot Cell* **1**: 163-173.
- Witteveen, C.F. & J. Visser, (1995) Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett* **134**: 57-62.
- Wood, J.M., (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 230-262.
- Wyder, M.T. & Z. Puhán, (1999) Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in aseptic cheese curd slurries. *Int Dairy J* **9**: 117-124.
- Wysocki, R., C.C. Chery, D. Wawrzycka, M. Van Hulle, R. Cornelis, J.M. Thevelein & M.J. Tamas, (2001) The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **40**: 1391-1401.
- Yale, J. & H.J. Bohnert, (2001) Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J Biol Chem* **276**: 15996-16007.
- Yamanishi, M., S. Katahira & T. Matsuyama, (2011) *TPS1* terminator increases mRNA and protein yield in a *Saccharomyces cerevisiae* expression system. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 2234-2236.

- Yancey, P.H., (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* **208**: 2819-2830.
- Yancey, P.H., M.E. Clark, S.C. Hand, R.D. Bowlus & G.N. Somero, (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.
- Yang, X.X., T. Wartmann, R. Stoltenburg & G. Kunze, (2000) Halotolerance of the yeast *Arxula adenivorans* LS3. *Ant Leeuw* **77**: 303-311.
- Zhuge, J., H.Y. Fang, Z.X. Wang, D.Z. Chen, H.R. Jin & H.L. Gu, (2001) Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**: 686-692.